



# Variabilité d'origine génétique et épigénétique de la pharmacodynamie des inhibiteurs de la calcineurine en transplantation rénale

Lucie Pouche

## ► To cite this version:

Lucie Pouche. Variabilité d'origine génétique et épigénétique de la pharmacodynamie des inhibiteurs de la calcineurine en transplantation rénale. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0017 . tel-01359496

**HAL Id: tel-01359496**

**<https://theses.hal.science/tel-01359496>**

Submitted on 15 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie Santé ED 524

Equipe d'accueil INSERM UMR 850

« Pharmacologie des immunosuppresseurs et de la transplantation »

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Pharmacologie

Présentée et soutenue par

**Lucie POUCHE**

Le 17 juin 2016

**Variabilité d'origine génétique et épigénétique de la pharmacodynamie  
des inhibiteurs de la calcineurine en transplantation rénale**

Thèse dirigée par Pr. Nicolas PICARD

## **JURY :**

### **Président du jury**

Pr. Marie Essig, PU-PH, Service de Néphrologie, Dialyse et Transplantation, CHU Limoges, faculté de médecine de Limoges

### **Rapporteurs**

Pr. Laure Elens, PU, Louvain Drug Research Institute, Université Catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique

Dr. Celine Verstuyft, MCU-PH, Service de Génétique Moléculaire, Pharmacogénétique et Hormonologie, CHU Bicêtre, Faculté de Médecine Paris Sud

### **Examineurs**

Dr. Remi Terranova, PhD, Novartis Institutes for BioMedical Research, Preclinical safety, Discovery and Investigative Safety, Basel, Switzerland

Pr. Nicolas Picard, PU-PH, Service de Pharmacologie, Toxicologie et de Pharmacovigilance, CHU Limoges, Faculté de pharmacie de Limoges (directeur de thèse)

# Remerciements

Je dédicace cette thèse à tous les chercheurs, des apprentis-chercheurs aux experts que j'ai rencontrés durant ces quatre années et grâce à qui j'ai pu réaliser ce travail. Se poser des questions, comprendre la biologie et raconter une histoire resteront une passion grâce à vous.

# Liste des abréviations

- AUA : Aire sous l'Activité
- AUC : Aire sous la Courbe
- BAM : *Binary alignment format*
- CPA : cellule présentatrice de l'antigène
- CsA : ciclosporine
- CYP : cytochrome P450
- DNMT : DNA methyltransferases
- DMRs : *differentiated methylated regions*
- FDR : *false discovery rate*
- GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating*
- GVH: Greffon versus Host
- GWAS : *Genome Wide Association Studies*
- HLA : *Human Leucocyte Antigen*
- ICN : inhibiteurs de la calcineurine
- IFN $\gamma$  : Interféron gamma
- IL2: Interleukine 2
- IP : immunoprécipitat
- lncRNA : ARN long non codant
- Log2FC : *log2 fold change*
- LT : Lymphocyte T
- MBD: *Methyl-CPG Binding Domain*
- MeDIP : *Methylated Immunoprecipitation*
- hMeDIP : *hydroxy-Methylated ImmunoPrecipitation*
- 5mC : 5-methyl cytosine
- 5hmC : 5-hydroxymethyl cytosine
- NGS : *Next Generation Sequencing*
- NODAT : *New Onset Diabetes After Transplantation*
- OR : *Odd Ratio*
- pb: paire de bases
- PCA : Analyse en Composant Principal
- PCR : *Polymerase Chain Reaction*
- RRBS : *Reducing Representation Bisulfite Sequencing*
- SAM : *Sequence Alignment Map*
- SI : Système immunitaire
- SNP : *Single Nucléotide Polymorphism*
- STP : Suivi Thérapeutique Pharmacologique
- TAC : tacrolimus
- TET : *Ten-Eleven Translocation*
- TNF $\alpha$  : *Tumor Necrosis Factor alpha*



# Sommaire

Liste des abréviations .....	3
Introduction .....	5
Chapitre 1. Eléments bibliographiques – Etat de l’art.....	7
A. Les inhibiteurs de la calcineurine .....	7
B. Epigénétique, régulation d’expression des gènes via la méthylation de l’ADN .....	13
Chapitre 2. Variabilité génétique et réponse aux ICN en transplantation .....	22
A. Variabilité génétique du système immunitaire .....	23
B. Application en transplantation rénale : étude « POLYCIS » .....	60
C. Discussion .....	78
Chapitre 3. Modifications épigénétiques induites par l’exposition aux ICN .....	82
A. Hypothèses et justification de l’étude .....	82
B. Travaux personnels : modification dynamique de la méthylation de l’ADN des LT CD4 après exposition à la ciclosporine et au tacrolimus .....	87
C. Perspectives .....	112
Conclusion générale .....	114
Bibliographie .....	116
Table des annexes.....	123
Table des illustrations.....	141
Table des tableaux .....	146

# Introduction

Les inhibiteurs de la calcineurine (ICN), la ciclosporine (CsA) et le tacrolimus (TAC), sont des immunosuppresseurs utilisés dans la transplantation d'organes. En inhibant la voie de la calcineurine au niveau du lymphocyte T (LT), ces derniers bloquent la synthèse de l'interleukine 2 (IL2), permettant l'activation lymphocytaire. Cette activation est à l'origine de l'organisation de la réponse immunitaire contre le greffon. Pris au long cours pour lutter contre le rejet de greffe, ces médicaments sont responsables de la survenue d'effets indésirables : néphrotoxicités irréversibles, participant à la « dysfonction chronique du greffon » ou rejet chronique, infections graves, troubles du métabolisme dont le diabète post-transplantation, tumeurs malignes notamment. La toxicité et l'efficacité du traitement par ICN est très variable d'un individu à l'autre (variabilité interindividuelle), ainsi que pour un même individu en fonction du temps (variabilité intra-individuelle). Ceci est expliqué par la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique. La variabilité pharmacocinétique est prise en compte par le suivi thérapeutique pharmacologique (STP), basé sur la mesure des concentrations sanguines des ICN une fois l'état d'équilibre atteint. Une adaptation de la dose est proposée afin d'atteindre les concentrations cibles permettant d'obtenir une immunosuppression efficace (cibles définies selon les caractéristiques du patient, des associations médicamenteuses, du délai post-greffe et du type de greffe). Chaque changement de posologie implique une période de stabilisation des concentrations (entre 3 et 5 demi-vies du médicament) avant d'effectuer un nouveau dosage de vérification. La variabilité pharmacodynamique, correspondant à la variation d'activité des cibles (cellulaires ou moléculaires) expliquant une différence de réponse du médicament, n'est pas mesurée dans le STP actuel des ICN.

Au travers de la pharmacogénétique et pharmacoépigénétique, nous avons exploré les différentes causes de la variabilité pharmacodynamiques des ICN. Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse d'université répondent à deux objectifs :

Premièrement, l'exploration de la variabilité génétique de la voie de la calcineurine et autres gènes impliqués dans la réponse immunitaire en transplantation a été menée afin d'identifier des biomarqueurs candidats capables d'expliquer ou de prédire les différences de réponse chez les patients transplantés. Pour cela, deux travaux d'exploration de la littérature et

une étude pharmacogénétique dans une population de transplantés rénaux ont été conduits et sont présentés au chapitre 2 de ce manuscrit. La première revue de la littérature portait sur la variabilité génétique de la réponse immunitaire post transplantation. L'objectif était de rassembler l'ensemble des données d'associations publiées entre des variants de gènes codants pour les acteurs du système immunitaire (SI) et les différents phénotypes en transplantation, et d'en identifier les variants candidats pertinents. La seconde portait sur la variabilité des gènes codants pour les protéines participant à la pharmacodynamie des principaux immunosuppresseurs non stéroïdiens utilisés en transplantation (les ICN, les inhibiteurs de la mTOR et le mycophénolate mofétil). L'attribution d'un « critère de qualité » basée sur la fonctionnalité de ces variants a permis d'identifier un nombre restreint de candidats potentiels. Les variants candidats des gènes codant pour la voie de la calcineurine ont ensuite été testés dans l'étude clinique « POLYCIS ». Cette étude a été réalisée à partir des données de patients transplantés rénaux, précédemment inclus dans des études cliniques pilotées par les services de Pharmacologie, Toxicologie et de Pharmacovigilance et de Néphrologie, Dialyse et Transplantation du CHU de Limoges.

Deuxièmement, nous avons exploré la variabilité épigénétique induite par l'exposition aux ICN au long cours. Nous avons émis l'hypothèse qu'une modification de l'expression des gènes de la voie de la calcineurine au sein des cellules cibles pouvait expliquer en partie la variabilité pharmacodynamique des ICN. Les LT présentent une grande plasticité dans l'expression génique largement contrôlée par des marques épigénétiques. La méthylation de l'ADN du LT CD4 comme marqueur d'influence médicamenteuse a été choisie comme approche. Une méthode d'immunoprécipitation de l'ADN méthylé a été développée sur la lignée cellules T immortalisées JURKAT. Une étude *in vivo* de la méthylation d'ADN des LT CD4 de souris traitées par ICN a été ensuite menée. L'analyse a été effectuée par séquençage haut débit (*Next Generation Sequencing*, NGS) pour rechercher l'effet potentiel des médicaments sur l'ensemble du génome murin. Les analyses bio-informatiques de ce projet sont toujours en cours cependant, des résultats préliminaires sont présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit.

# Chapitre 1. Eléments bibliographiques – Etat de l’art

## A. Les inhibiteurs de la calcineurine

### 1. Traitement immunosuppresseur de référence en transplantation rénale

Les inhibiteurs de la calcineurine, famille actuellement composée de la ciclosporine et du tacrolimus, sont aujourd’hui considérés comme les immunosuppresseurs les plus efficaces en terme de lutte contre les phénomènes de rejet aigu à la suite d’une transplantation (1). Il existe aujourd’hui un nouvel inhibiteur appelé voclosporine, dont la structure chimique est très proche de celle de la ciclosporine, mais qui ne possède pas d’indication en transplantation pour le moment (2). Malgré le développement de nouveaux médicaments depuis les années 1980, la prescription d’un ICN associé à un anti métabolite, avec ou sans corticoïdes, reste le traitement immunosuppresseur au long cours de référence contre le rejet de greffe rénale (recommandations KDIGO, Kidney Disease Improving Global Outcomes, 2011) (3).

### 2. Mécanisme d’action : inhibition de la voie de la calcineurine

Les ICN agissent en inhibant de la voie de la calcineurine au sein du LT. Cette voie participe à la transmission du signal d’activation donné par le récepteur TCR. L’activation de la voie entraîne un relargage de calcium depuis les organites intracellulaires ainsi qu’une entrée du calcium extracellulaire, via les canaux membranaires. Le calcium permet ensuite l’activation de la calcineurine. La calcineurine est une enzyme composée de deux sous-unités : catalytique (calcineurine A) possédant une activité phosphatase, et régulatrice (calcineurine B) maintenant l’enzyme dans un état inactif. La calmoduline, activée par une augmentation du calcium intracellulaire, se fixe sur la calcineurine (4). Le complexe protéique libère le site actif de la sous unité catalytique, permettant la déphosphorylation et la translocation nucléaire du facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of activated T cells*) via l’activité phosphatase. Cette migration induit la transcription de nombreux gènes impliqués dans l’activation lymphocytaire, comme l’interféron gamma (IFN $\gamma$ ), le *Granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), l’IL2 ainsi que les gènes codant pour son récepteur : Récepteur à l’IL2 (IL2R)  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (5). Les ICN agissent après s’être fixés sur deux

immunophilines intra cytoplasmiques distinctes : la cyclophilline A et le FKBP-12 pour la ciclosporine et le tacrolimus respectivement. Les complexes immunophilines-médicaments se fixent sur des résidus protéiques à la fois de la partie catalytique et régulatrice de la calcineurine, bloquant son activité phosphatase et empêchant la translocation nucléaire de NFAT (6). L'absence de translocation du facteur bloque l'activation transcriptionnelle et ainsi la stimulation des LT.

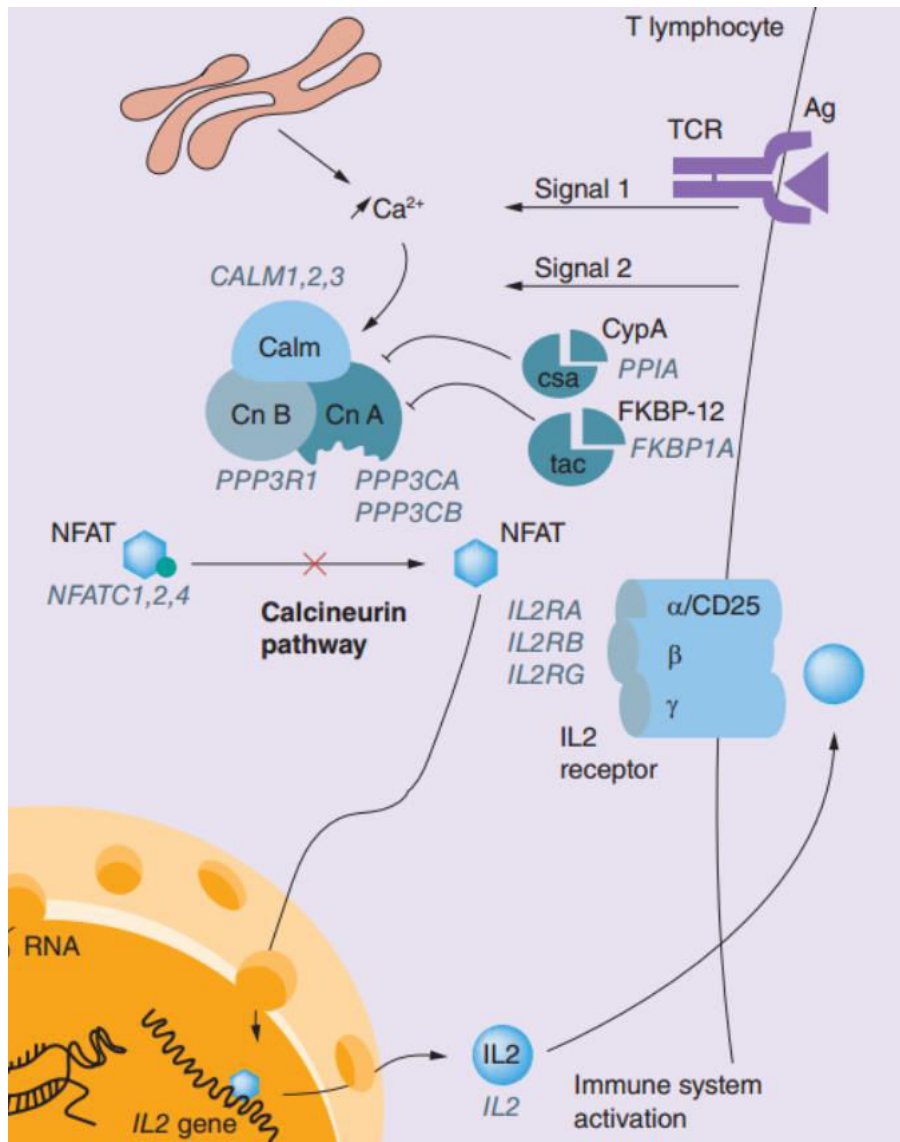


Figure 1. Voie de la calcineurine au sein du lymphocyte T (Ag : antigène ; Calm: Calmoduline; Cn A: Calcineurine A; Cn B: Calcineurine B; Csa: Ciclosporine; Cyp A: Cyclophilline A; NFAT: Nuclear factor activated T cell). L'état phosphorylé du facteur NFAT est indiqué par un cercle vert (7).

### 3. Indications et effets indésirables

Le tacrolimus, sous forme de gélule, comprimé et solution pour perfusion est seulement indiqué en transplantation (prévention du rejet du greffon hépatique, rénal et cardiaque) mais possède une indication pour le traitement des dermatites atopiques sous forme de pommade. Par voie orale ou injectable, la ciclosporine possède de nombreuses indications « hors greffe » : uvéites endogènes, syndromes néphrotiques, polyarthrite rhumatoïde, psoriasis et dermatite atopique (8).

Néphrotoxicité, hypertension artérielle, leucopénies, troubles du métabolisme (hyperglycémie et diabète), troubles digestifs type diarrhées, troubles neurologiques type céphalées, tremblements, paresthésies font partie des effets indésirables les plus fréquemment rapportés après la prise d'ICN (8). La néphrotoxicité est l'effet indésirable le plus grave en transplantation rénale car elle participe à la perte du greffon. Elle se manifeste d'abord par une diminution du débit de filtration glomérulaire, modification hémodynamique réversible dans un premier temps, appelée « néphrotoxicité aiguë ». Elle évolue vers des lésions définitives de tous les compartiments du rein (glomérulosclérose, atrophie tubulaire et fibrose tubulo-interstitielle). Ces anomalies, regroupées sous le nom de « dysfonction chronique du greffon », ainsi que les rejets aigus, peuvent aboutir à la perte du greffon (9). Les lésions décrites sont non spécifiques et de ce fait, il est difficile de discerner la part médicamenteuse dans la perte du greffon. Aujourd'hui, la biopsie rénale est le diagnostic de référence des dysfonctions du greffon (10). Cependant des biomarqueurs plus spécifiques sont en cours de développement. Sigdel et col. ont identifié une dizaine de biomarqueurs spécifiquement retrouvés dans les urines de patients ayant développé un rejet aigu (à titre d'exemple, l'alpha-2-macroglobuline, les chaînes alpha et beta du fibrinogène (FGA et FGB), et la protéine S vitamine K dépendent) (11).

### 4. Suivi thérapeutique pharmacologique des ICN

Le développement d'effets indésirables ou le manque d'efficacité sont très variables d'un patient à un autre, et liés à la variabilité pharmacocinétique et pharmacodynamique des ICN. Le patient risque, en cas de sous-exposition, la survenue d'épisode de rejet par inefficacité (augmentant le risque de perte du greffon), en cas de surexposition, des épisodes d'insuffisance rénale aiguë, des infections graves, néphrotoxicité, et un risque accru de cancer. Du fait de ce faible index thérapeutique, ces médicaments sont soumis à un Suivi Thérapeutique Pharmacologique (STP) obligatoire en France (12). La Société Française de

Pharmacologie et de Thérapeutique définit le STP comme « l'activité qui consiste à doser les concentrations sanguines d'un médicament et à les interpréter, en fonction du terrain, pour ajuster la dose administrée à chaque individu » (13). La plupart des centres de transplantation adaptent la posologie de la ciclosporine à partir des mesures de la concentration sanguine résiduelle ( $C_0$ ) ou de la concentration 2 heures après la prise ( $C_2$ ) ; celle du tacrolimus est essentiellement effectuée sur les valeurs du  $C_0$ . L'adaptation basée sur l'estimation de l'Aire sous la Courbe (AUC) est considérée comme le meilleur marqueur de l'exposition (14). Des stratégies de prélèvements dites « limitées » sont proposées aujourd'hui en routine dans les centres de transplantations (15).

## 5. Recherche en pharmacogénétique

Cette variabilité de réponse peut également être expliquée en partie par la variabilité génétique des individus. La pharmacogénétique est l'étude du lien entre certaines caractéristiques génétiques constitutionnelles d'un individu et la réponse de l'organisme à l'égard des médicaments (Règles de bonnes pratiques en génétique constitutionnelle à des fins médicales) (16). Cette discipline est basée sur l'identification de polymorphismes génétiques localisés dans les gènes codant pour les protéines du métabolisme, les transporteurs et les protéines cibles des médicaments.

Concernant la réponse aux ICN, les gènes codant pour les protéines impliquées dans leur pharmacocinétique, notamment les cytochromes P450 (CYPs) 3A4 et 3A5, ont été particulièrement étudiés (17).

Il a été démontré dans de nombreuses publications qu'un *single nucleotide polymorphism* (SNP) du *CYP3A5* (*CYP3A5\*3*, rs776746, 6986A>G, localisé dans l'intron 3 du gène) était le principal facteur génétique influençant les concentrations résiduelles de tacrolimus (18). Ce SNP est à l'origine d'un défaut d'épissage lors de la transcription, responsable de l'introduction d'un codon stop dans la séquence de l'ARNm et ainsi d'une protéine tronquée non fonctionnelle (19). Les porteurs homozygotes de l'allèle *CYP3A5\*3* ne possèdent aucune fonction enzymatique de l'isoforme et sont considérés comme « non expresseurs » du *CYP3A5* contrairement aux porteurs d'un allèle sauvage *CYP3A5\*1* considérés comme « expresseurs » (hétérozygotes *CYP3A5\*1/3* et homozygotes *CYP3A5\*1/1*). Malgré le débat concernant son intérêt en pratique clinique, une adaptation de la dose *a priori* est aujourd'hui proposée en fonction du génotype réalisé en amont de la



greffe (20). Il est recommandé d'initier le traitement avec une posologie 1,5 à 2 fois plus haute que la posologie usuellement recommandée chez les « expresseurs » (variable selon le contexte clinique et le type de greffe) sans toutefois dépasser 0.3mg/kg/jour, puis d'adapter selon les concentrations sanguines de tacrolimus une fois l'état d'équilibre atteint (21).

De nombreux variants ont été identifiés dans le gène *CYP3A4* sans toutefois présenter de réel intérêt clinique. Toutefois, le variant intronique rs35599367 responsable de l'allèle *CYP3A4\*22* semble prometteur : associé à une diminution de l'ARNm et de l'activité enzymatique du CYP3A4, il est responsable d'une diminution de la clairance de la CsA et du TAC chez les patients transplantés rénaux (22)(23). Son influence semble particulièrement importante chez les non expresseurs du CYP3A5, pour lesquels le métabolisme des ICN est principalement effectué par le CYP3A4 (24).

Une fois l'état d'équilibre atteint, il semble que la variabilité pharmacocinétique expliquée par ces variants génétiques soit prise en compte lors de la première mesure des concentrations sanguines. Cependant, la recherche de ces variants doit être considéré comme complémentaire au STP actuel : le génotypage réalisé avant la greffe permet de proposer une première posologie d'ICN adapté au patient et ainsi d'atteindre plus rapidement la concentration cible.

## 6. Biomarqueurs pharmacodynamiques

Même si la concentration sanguine cible est atteinte et maîtrisée, la variabilité d'activité du système immunitaire peut expliquer des différences de réponse thérapeutique. Ainsi, mesurer l'activité des cibles pharmacodynamique des cellules cibles immunitaires permettrait de prédire la variabilité pharmacodynamique de la réponse aux ICN.

L'idée la plus évidente a été tout d'abord de mesurer l'activité phosphatase de la calcineurine au sein des LT ou des leucocytes circulants sanguins chez des patients transplantés traités par ciclosporine ou tacrolimus. De nombreuses études ont étudié le rapport concentration plasmatiques de la CsA/activité calcineurine (Aire sous l'activité, AUA<sub>0-12h</sub>) et la majorité d'entre elles ne montrent pas de corrélation du fait d'une large variabilité interindividuelle pharmacodynamique. Les quelques études ayant mesuré l'activité calcineurine chez les patients traités par TAC montre (i) une activité calcineurine plus faible chez les patients traités par CsA *versus* TAC, (ii) une absence de corrélation de l'activité avec le C<sub>0</sub> de TAC. En revanche, il a été montré que des patients transplantés hépatiques et traités par CsA ou TAC présentaient une activité calcineurine plus importante lorsqu'ils étaient



sujets à un rejet aigu (25). Ainsi, la variabilité pharmacodynamique participe à la réponse thérapeutique des patients traités par CsA et TAC et n'est pas corrigé par le STP actuel (26). Cependant, du fait de la grande variabilité de mesure expliquée par le fait que la phosphatase est très sensible aux conditions expérimentales, le dosage de l'activité calcineurine ne semble pas être le meilleur marqueur pharmacodynamique dans ce contexte (25).

La mesure de l'expression des gènes dont l'activation dépend du facteur NFAT a également été proposée. Cette analyse est basée sur la quantification en ARNm d'*IL2*, *IFNG* et *GMCSF*, après stimulation *ex vivo*, dans le sang total juste avant ou 2 heures après la prise du médicament (27). A l'inverse de la variabilité interindividuelle, la variabilité intra-individuelle d'expression des gènes « NFAT dépendants » est faible, en particulier chez les patients avec une posologie d'ICN stable (27). Des seuils d'expression ont été proposés afin d'anticiper certains effets indésirables. A titre d'exemple, le risque de développer un cancer cutané chez patients âgés de plus de 65 ans traités par ciclosporine devient important lorsque l'expression résiduelle est inférieure à 15% de l'activité basale (28). De par sa réalisation technique et les premiers résultats, cette analyse semble plus prometteuse que le dosage de l'activité calcineurine, notamment pour évaluer des diminutions de posologie de ciclosporine. Cela concernerait des patients ayant des valeurs de concentrations en ICN élevées et des valeurs d'expression de gènes « NFAT dépendants » faibles. Un essai clinique évaluant la diminution du risque cardiovasculaire après diminution de posologie de ciclosporine sous contrôle de l'expression des gènes « NFAT dépendants » est en cours. Concernant le tacrolimus, les études sont pour l'instant trop peu nombreuses pour proposer une application clinique (27).

## 7. Pharmacogénétique des cibles des ICN

De même que pour les gènes codant pour les enzymes du métabolisme, la variabilité d'expression des gènes cibles peut participer à la variabilité pharmacodynamique interindividuelle des ICN. Ainsi, une activité basale anormale des LT (trop importante ou trop faible) pourrait être expliquée par la présence de certains variants de la voie de la calcineurine et participer à cette variabilité d'expression. L'exploration des gènes codant pour la voie de la calcineurine mais également ceux codant pour les cytokines impliquées dans la réponse immunitaire pourrait apporter une information supplémentaire dans la variabilité

pharmacodynamique. Du fait de la complexité des voies cellulaires, ces pharmacogènes ont été peu explorés pour l'instant en transplantation (7).

Dans le cadre du présent travail, nous avons réalisé une recherche bibliographique approfondie. Un premier regard a été porté sur la variabilité génétique impliquée dans la réponse immunitaire en transplantation d'organe solide. Une deuxième revue de littérature présente une liste de variants présents dans les gènes cibles et classés comme étant de bons candidats pour l'étude de la variabilité pharmacodynamique des principaux immunosuppresseurs utilisés en transplantation.

## **B. Epigénétique, régulation d'expression des gènes via la méthylation de l'ADN**

### **1. L'épigénétique : mode de régulation de l'expression des gènes**

La variabilité de la séquence de l'ADN explique en grande partie les différences de phénotype entre les individus. Cependant, l'environnement extérieur a une influence sur l'expression génique et participe à la variabilité interindividuelle d'expression des gènes. Par exemple, deux jumeaux monozygotes possédant exactement le même patrimoine génétique, présenteront toutefois des différences phénotypiques importantes. Ces différences seront plus marquées à l'âge adulte que durant l'enfance, laissant suggérer l'influence progressive de stimuli extérieurs. Cette régulation d'expression se retrouve également au sein d'un même organisme, où les cellules de chaque tissu expriment un panel de protéines qui leur est spécifique malgré une séquence d'ADN similaire à celle d'autres types cellulaires.

La régulation épigénétique est le facteur expliquant cette complexité phénotypique. Plus précisément, elle correspond à tout changement d'activité ou de fonctionnement du génome qui n'implique pas de changement au niveau de la séquence d'ADN et qui est héritable au cours de la mitose ou de la méiose (29).

Ces modifications d'activités, dynamiques, réversibles et tissu spécifiques, se manifestent au travers des marques épigénétiques apposées à proximité des gènes et permettent des modifications d'interactions avec les enzymes et facteurs de la transcription. Ces marques sont des groupements chimiques apposés sur l'ADN (notamment des groupes méthyl) ou sur la structure protéique autour de laquelle s'entoure l'ADN, appelé nucléosome. Le nucléosome

est composé de protéines histones organisées en dimères (H2A, H2B, H3 et H4) dont l'extrémité N terminale (queue de l'histone) est utilisée pour l'ajout des marques. Cela entraîne une modification de l'état chromatinien (ensemble ADN/nucléosome), permettant un accès plus ou moins facile aux facteurs de transcription. Quatre types de modifications des histones sont décrits : la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation et l'ubiquitination (30). Une annotation particulière permet de préciser l'histone et le résidu protéique concernés (marqués) puis le groupe chimique ajouté. Par exemple, la marque H3K27me3 est une triméthylation ajoutée sur la 27ème lysine de l'histone 3. Elles forment un code qui dicte l'état chromatinien et la manière de contrôler l'expression d'un gène. Par exemple, la marque H3K27me3 est associée à une inhibition de la transcription (31). Sans être considérés comme des marques car non fixés de façon covalente à la chromatine, les ARN non codants interviennent également dans la régulation d'expression génique (Figure 2).

Le signal épigénétique doit être « lu » pour ensuite se traduire en une réponse cellulaire. La lecture se fait par des protéines spécialisées. Elles activent des protéines catalytiques impliquées dans des complexes régulateurs pour engendrer une réponse d'activation de la transcription ou d'extinction du gène. Les enzymes « marqueuses », « effaceuses » et « lectrices » sont spécifiques de chaque marque mais coopèrent pour former un véritable « code épigénétique » (30) (Figure 3).

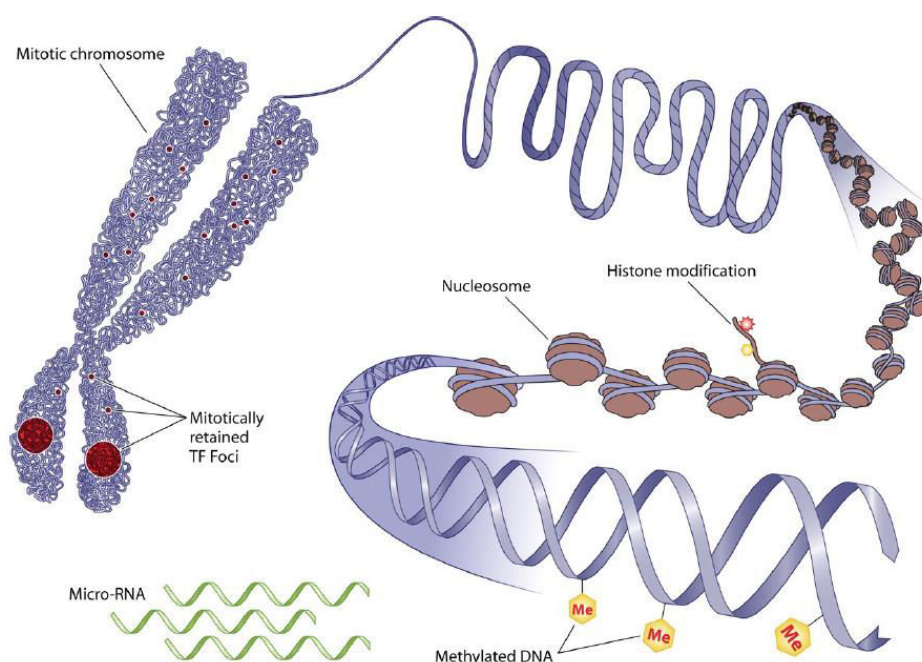


Figure 2. Principaux mécanisme de régulation épigénétique (32).

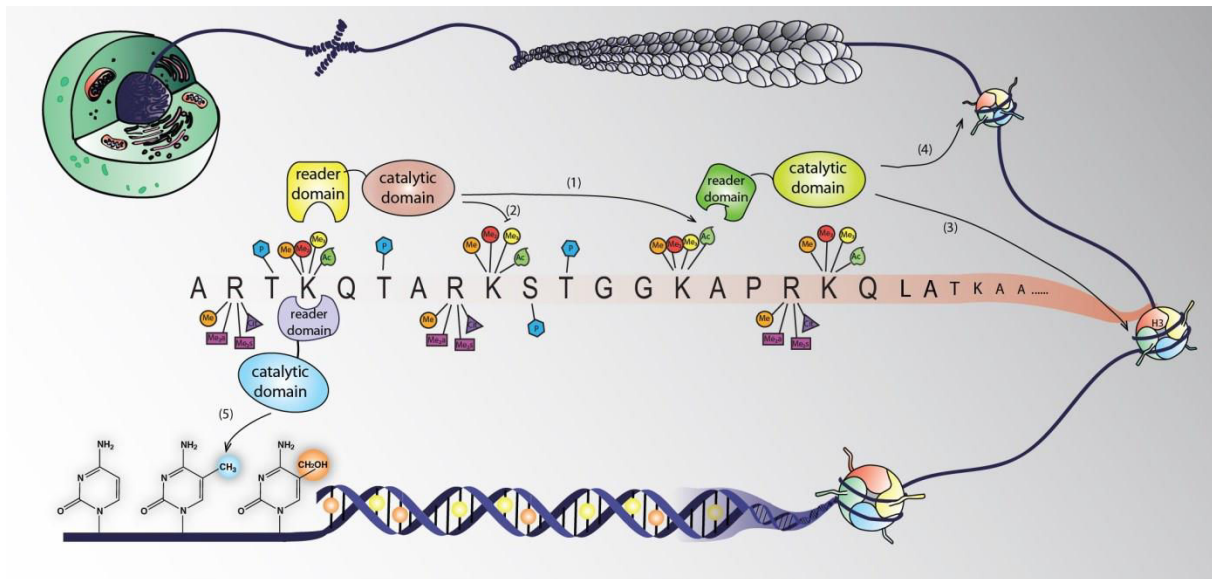


Figure 3. Coopération entre les protéines de lecture des marques méthylées H3K (*reader domain*) et les protéines catalytiques (*catalytic domain*) pour apposer la marque cytosine méthylée sur l'ADN (extrait de [denulab.discovery.wisc.edu](http://denulab.discovery.wisc.edu))

## 2. La méthylation et l'hydroxyméthylation de l'ADN

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN s'effectue sur une base cytosine précédant une base guanine, correspondant à un dinucléotide CpG. La base transformée est appelée 5-méthyl cytosine (5mC). Les méthylations sont apposées grâce à des DNA methyltransférases ou DNMTs. Il existe deux types de DNMTs : celles ayant une action *de novo* sur un ADN non méthylé (DNMT3a, 3b ou 3L), et celle dont le rôle est de répliquer la méthylation lors de la mitose afin de maintenir la marque malgré les divisions cellulaires (DNMT1).

Durant plusieurs années, le dysfonctionnement de cette maintenance était décrit comme seul mécanisme de deméthylation de l'ADN. Cependant, une voie active de deméthylation des cytosines a été récemment proposée, par l'action des protéines *Ten-eleven translocation* (TET). Celle-ci transforme la 5mC en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC). Elle est ensuite transformée en produits reconnus par les enzymes de réparations de l'ADN (5-formyl et 5-carboxyl cytosines) et remplacée par une nouvelle base cytosine non modifiée (Figure 4).

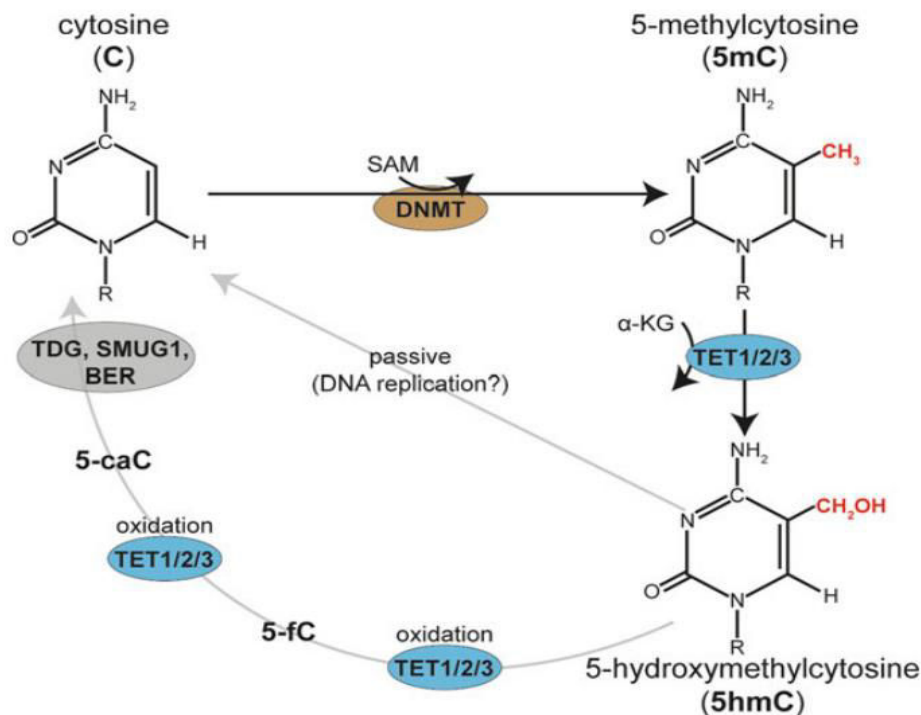


Figure 4. Cycle de la deméthylation de l'ADN (33)

Alors que la méthylation a longtemps été associée à une répression de la transcription, il semblerait qu'elle soit au final essentielle à l'expression de certains gènes (34). Certaines régions du génome riches en CpG, appelées îlots CpG, sont majoritairement pauvres en méthylation. Cependant, au niveau des régions promotrices, leurs niveaux de méthylation permettent de classer la fonctionnalité des gènes :

- Les promoteurs riches en CpG semblent hypométhylés et correspondent à des gènes le plus souvent exprimés de façon ubiquitaire.
- Les promoteurs avec un niveau intermédiaire de CpG ont un degré variable de méthylation, modifiable ayant pour conséquence une modification d'activité.
- Les promoteurs pauvres en CpG sont hyperméthylés et sont associés à des gènes dont l'expression est tissu spécifique (34). (Figure 5)

L'étude du méthylome révèle également des zones largement hypométhylées en dehors des régions promotrices. Ces « gaps » de méthylation pourraient correspondre à des régions de régulation appelées « enhancers » (35). Le consortium ENCODE a révélé l'existence de nombreux sites de régulation du génome (identifiés grâce à la DNase1) à distance des régions

géniques. Ces régions « *enhancers* », de taille en général inférieure à 1kb, sont dotées de nombreux sites de fixation de facteurs de la transcription et possèdent un niveau de 5mC très bas. Elles auraient la capacité d'activer la transcription de gènes à distance et permettraient notamment d'activer l'expression des gènes caractérisant la spécificité cellulaire (Figure 5) (36).

En plus de son rôle d'intermédiaire dans la deméthylation de l'ADN, la marque 5hmC posséderait également une fonction régulatrice à part entière. En effet, il a été montré qu'elle était plus abondante dans les régions « *enhancers* » et dans d'autres zones d'activation transcriptionnelle des gènes (34)(37). Les rôles de 5mC et 5hmC semblent complémentaires.

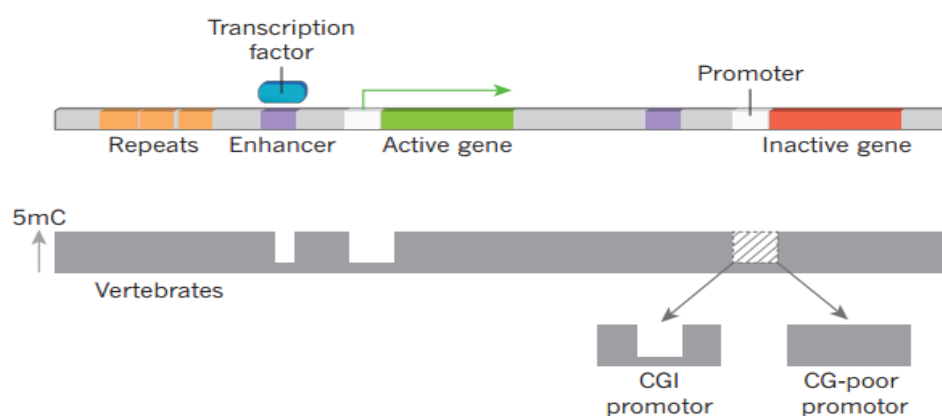


Figure 5. Répartition de la méthylation de l'ADN chez les vertébrés (35)

Plusieurs scénarios sont proposés pour expliquer l'action de la méthylation sur la transcription, notamment la diminution d'affinité pour des facteurs de transcription méthyl-sensibles ou l'intervention de protéines intermédiaires, possédant un *methyl-CPG binding domain* (MBD) (Figure 6) (35).

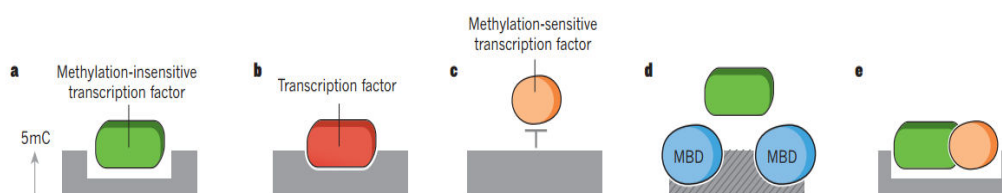


Figure 6. Différents scénarios proposés pour le rôle de méthylation dans la régulation d'expression. 5mc : 5-methylcytosine, MBD : *methyl-CPG binding domain* (35).



La méthylation de l'ADN a un rôle important dans la conservation de la stabilité du génome. Elle est impliquée dans l'expression spécifique de certains allèles (gènes à empreinte) et dans l'extinction des retro transposons ou d'autres éléments hyper répétés du génome. Elle semble également essentielle au développement embryonnaire et à la différenciation cellulaire (38).

### 3. Méthodes d'études de la méthylation de l'ADN

Deux grands types d'analyses permettent d'étudier la méthylation de l'ADN : le traitement par bisulfite de sodium et les méthodes d'immunoprécipitation. L'utilisation du bisulfite est considérée comme le « *gold standard* » de l'analyse de la méthylation de l'ADN. Il permet une lecture de la méthylation à la base près. L'immunoprécipitation est plus adaptée à un contexte exploratoire car elle permet d'avoir une vision globale de la méthylation du génome.

#### a. Analyses au bisulfite de sodium

Le bisulfite de sodium est un agent réducteur capable de transformer une base cytosine en uracile. En revanche, lorsque celle-ci est méthylée, la réduction n'est pas possible et la cytosine est conservée (Figure 7).

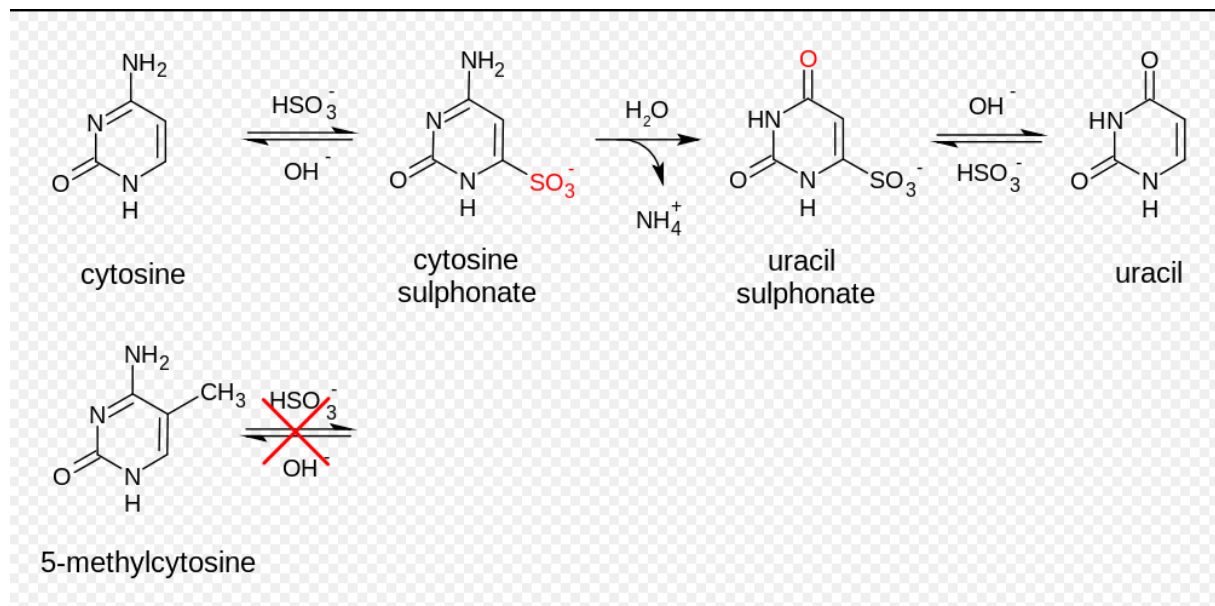


Figure 7. Réaction de réduction menée par le bisulfite de sodium ( $\text{HSO}_3^-$ )

Le traitement au bisulfite est particulièrement utilisé dans les approches « gènes spécifiques ». Deux techniques sont utilisées : la PCR dite « méthylation spécifique » et le « *bisulfite sequencing* ». La première utilise des amorces complémentaires contenant au moins un dinucléotide CpG (i.e. un motif CG sur le même brin d'ADN). Ainsi, la détection de la méthylation se fait au moment de la PCR. Si le dinucléotide est méthylé, seul l'amorce possédant le C permet l'amplification ; dans le cas contraire, c'est l'amorce porteuse du T. L'analyse des produits PCR est ensuite effectuée après migration sur gel (Figure 8). Le *bisulfite sequencing* est dit « méthylation indépendant » : plusieurs couples d'amorces, ne contenant pas de CpG, sont utilisés pour analyser plusieurs régions d'intérêts et indépendamment de leurs statuts de méthylation (39). Les amplicons sont ensuite analysés par technique de pyroséquencage par exemple (Figure 8).

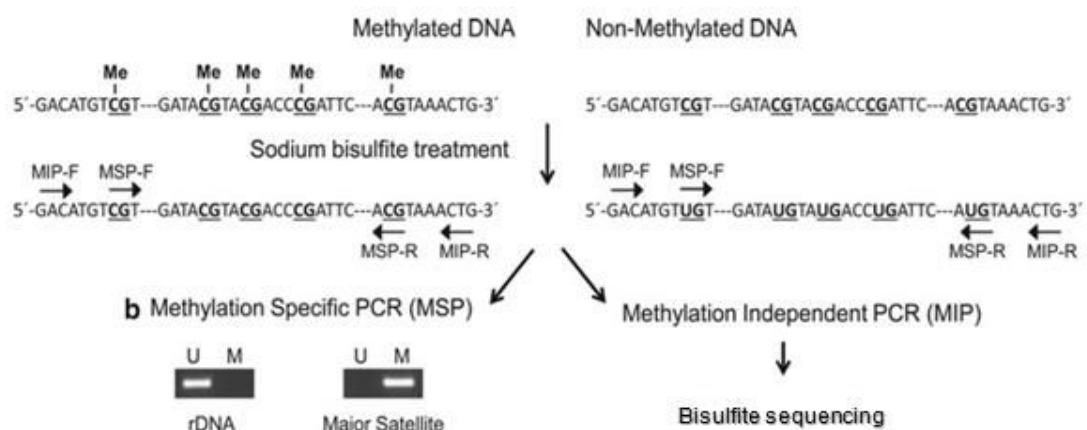


Figure 8. Exemple d'amorces pour la PCR méthylation spécifique (MSP-F pour amorce sens et MSP-R pour amorce antisens) et pour le bisulfite sequencing (MIP-F pour amorce sens et MIP-R pour amorce antisens) ; U : unmethylated ; M : methylated (39).

Des techniques couplant bisulfite et détection sans *a priori* ont été également développées : le methylC-seq, la technique « *reducing representation bisulfite sequencing* » ou RRBS et la puce Infinium *Human methylation 450 K bead* sont les principales utilisées aujourd'hui. A titre d'exemple, le RRBS couple une étape de digestion par enzyme de restriction et détection par séquençage haut débit. Une enzyme de restriction non sensible à la méthylation (comme Msp1) digère l'ADN génomique ; elle coupe le motif CCGG en amont



du CG, de façon à ce que chaque fragment possède le dinucléotide à son extrémité. Après fixation d'adaptateurs pour le séquençage, les fragments sont ensuite traités par bisulfite puis séquencés (Figure 9) (40).

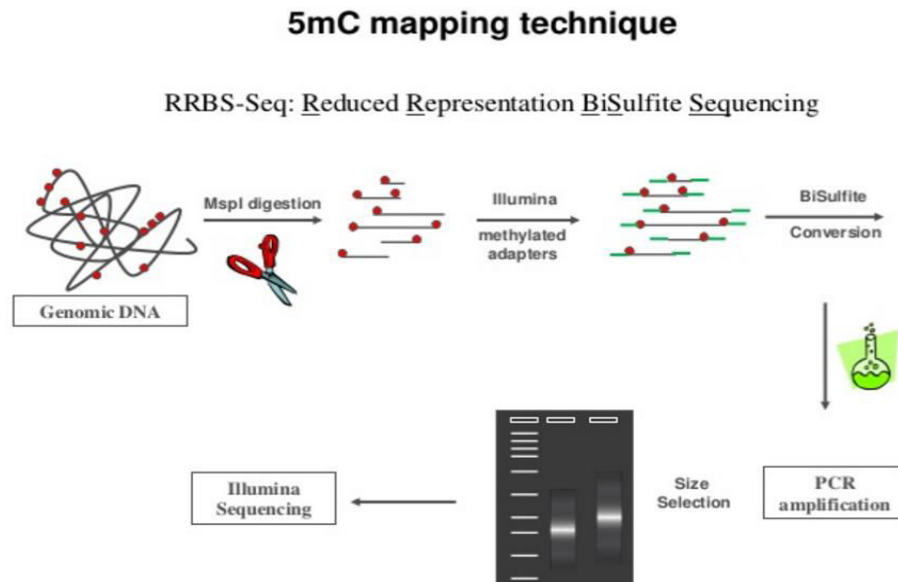


Figure 9. D'après Swati Kadam, Ph.D., Marketing Intern Aug, *Advances in Epigenetics*, Illumina 2013.

### b. Les techniques d'immunoprécipitation

Ces techniques utilisent des anticorps reconnaissant la marque méthylée ou hydroxyméthylée, permettant la précipitation des fragments d'ADN porteurs de la marque: MeDIP pour *Methylated Immunoprécipitation*, ou hMeDIP pour *hydroxy-Methylated ImmunoPrecipitation*. Après fragmentation mécanique (le plus souvent par sonicateur à ultrasons), les fragments d'ADN sont incubés avec l'anticorps puis la précipitation est effectuée à l'aide de billes magnétiques couplées à l'anticorps. La détection peut être effectuée par PCR pour une approche « gène spécifique » (MeDIP-qPCR), ou par séquençage pour une approche *sans a priori* (MeDIP-seq) (Figure 10).

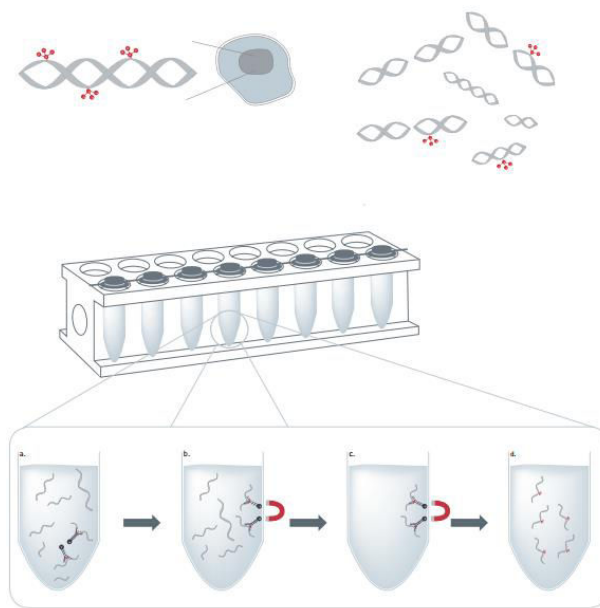


Figure 10. Principe du MeDIP (MagMeDIP Kit, Diagenode, [www.diagenode.com](http://www.diagenode.com))

#### 4. Pharmacogénétique

De même que l'environnement influence le phénotype d'un individu via l'expression de ses gènes, un traitement médicamenteux peut modifier l'expression génique des pharmacogènes et aboutir à une différence de réponse thérapeutique. La pharmacogénétique n'explique pas la totalité de la variabilité interindividuelle de la réponse aux médicaments : le manque de réplique des associations positives et la complexité des phénotypes étudiés révèlent l'existence d'une variabilité d'expression des gènes non expliquée par les variations de la séquence d'ADN.

La pharmacogénétique est l'étude des modifications influençant l'expression des pharmacogènes, non due à une modification de la séquence d'ADN et donnant lieu à une modification de la réponse aux médicaments. D'une part, le statut épigénétique basal d'un individu pour un tissu donné influence probablement la réponse à certains médicaments (variabilité interindividuelle). D'autre part, l'exposition à un médicament au long cours peut modifier l'expression d'un gène cible et expliquer une modification de la réponse (variabilité intra-individuelle). En plus d'enrichir nos connaissances sur les mécanismes d'action ou sur la toxicité des médicaments, la pharmacogénétique permet la découverte de nouveaux biomarqueurs de l'efficacité ou de la sécurité d'un médicament, en complément des biomarqueurs génétiques.

## Chapitre 2. Variabilité génétique et réponse aux ICN en transplantation

La pharmacogénétique en transplantation est un domaine de recherche particulièrement complexe. La régulation du système immunitaire (SI) par le traitement immunosuppresseur conditionne la tolérance de l'organisme vis à vis du greffon. Cependant, le SI implique de nombreux acteurs à l'origine d'une variabilité interindividuelle importante de la réponse immune vis-à-vis des régimes immunosuppresseurs. Cela explique en partie la complexité des phénotypes étudiés, notamment dans la définition des rejets immunitaires.

Les covariables requises permettant d'étudier spécifiquement le rôle d'un variant génétique en transplantation sont multiples: l'âge du donneur et du receveur, la compatibilité HLA donneur/receveur, la présence d'anticorps anti donneur au préalable. D'autres facteurs liés à la chirurgie d'explantation et de transplantation entrent également en compte. Des stratégies d'analyses multivariées doivent donc être appliquées pour prendre en compte l'effet réel du variant. De plus, l'amélioration et l'optimisation des régimes immunosuppresseurs ont permis d'obtenir une diminution importante du nombre de rejets aigus, expliquant la nécessité d'inclure un plus grand nombre de patients dans les études pharmacogénétiques.

Deux approches complémentaires sont appliquées pour identifier des variants impliqués dans la réponse médicamenteuse: les *Genome Wide Association Studies* (GWAS) permettent d'identifier des gènes non encore connus dans la réponse thérapeutique ou des variants localisés dans des régions non codantes du génome mais demande un nombre important de patient et un phénotype d'étude souvent bien défini. Les études « gènes candidats » sont basées sur une hypothèse biologique *a priori*, permettent de travailler avec des phénotypes complexes mais sont souvent limitées à l'étude d'un ou de deux gènes d'intérêt. En transplantation, des stratégies de sélection de variants d'intérêt dans des gènes candidats sont plus appropriées du fait de la grande hétérogénéité des phénotypes étudiés

## A. Variabilité génétique du système immunitaire

### 1. Rappel sur la réponse immunitaire

Le fonctionnement du SI implique de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires à l'origine d'une variabilité d'activité basale importante. Les LT CD4 (ou LT CD4+ « *helper* ») sont les cellules initiateuses du rejet immunitaire contre le greffon de par leur capacité à activer les autres leucocytes par sécrétion de cytokines. Ils sont activés lors de la présentation de l'antigène sur une molécule CMH de classe II (complexe d'histocompatibilité II ou HLA, *human leucocyte antigen*). L'interaction entre le récepteur TCR du LT CD4 et le CMH de la cellule présentatrice de l'antigène (CPA) ou signal 1 est ensuite renforcée par la co-stimulation ou signal 2 (impliquant LFA-1, CD80 et CD40, détaillé dans l'article ci-après). En transplantation, la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïf peut produire des cellules T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 et T régulateurs (Treg). La production de cellules T<sub>H</sub>1 mène à une immunité cellulaire, tandis que la production de cellules T<sub>H</sub>2 mène à une immunité humorale. La différence entre les cellules T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2 réside dans les patrons de cytokines produites. Les cellules T<sub>H</sub>1 sécrètent principalement l'INF- $\gamma$ , l'IL-2, le TNF- $\alpha$  et le TNF- $\beta$ , tandis que les cellules T<sub>H</sub>2 sécrètent principalement l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (41). Les cellules T<sub>H</sub>17 jouent un rôle important dans les rejets chroniques (42). Les Treg sont impliqués dans la tolérance du greffon et via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Figure 11).

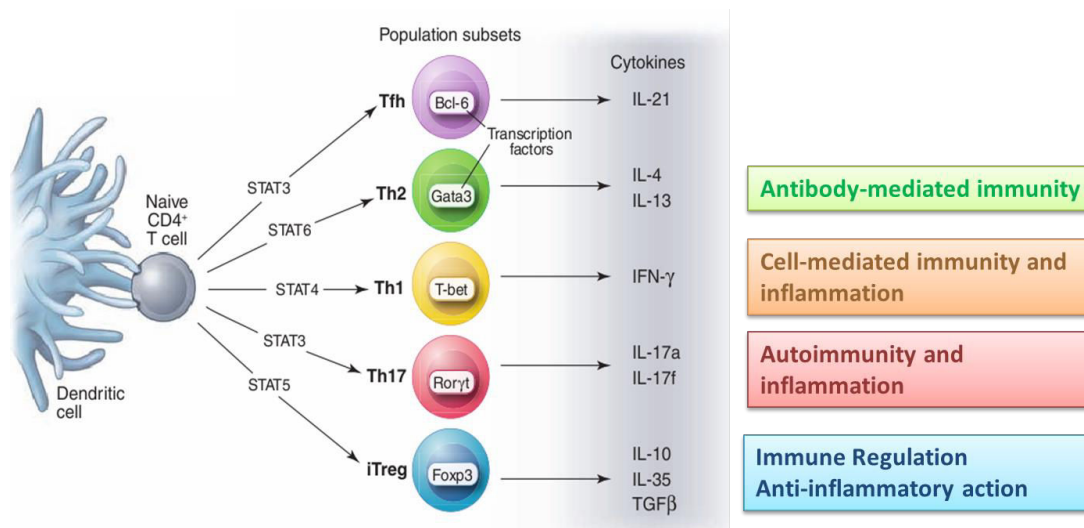
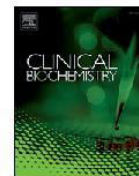


Figure 11. Spécialisation du LT CD4 (Th: T helper ; STAT: *Signal transducer and activator of transcription*, facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire) (43)

## 2. Polymorphismes génétiques de la réponse immune impliqués en transplantation rénale

L'activité basale du SI varie d'un individu à l'autre, ce qui pourrait être en partie expliquée par la présence de variants génétiques dans les gènes codants pour les acteurs du SI. Cependant, peu de ces variants ont été associés à différents phénotypes en transplantation. Le manque de puissance, la non réplcation des associations, ainsi que l'absence d'ajustement sur des variables non génétiques sont souvent à l'origine de publications d'associations faussement positives. Une sélection d'études d'associations génétiques considérant les molécules impliquées dans la réponse immunitaire en transplantation a été réalisée afin d'identifier les variants d'intérêts potentiels en clinique. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal *Clinical Biochemistry*.



# Genetic polymorphisms in the immune response: A focus on kidney transplantation



Jana Stojanova<sup>a</sup>, Lucie Pouché<sup>b,c</sup>, Nicolas Picard<sup>b,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Chemical Carcinogenesis and Pharmacogenetics, University of Chile, Santiago, Chile

<sup>b</sup> Inserm, UMR 850, F-87000 Limoges, France

<sup>c</sup> CHU Limoges, Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, F-87042 Limoges, France

<sup>d</sup> Univ. Limoges, Faculté de Pharmacie, Service de Pharmacologie, F-87025 Limoges, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 30 March 2015

Received in revised form 4 July 2015

Accepted 8 July 2015

Available online 11 July 2015

### Keywords:

Transplantation

Immune response

Immunosuppressive therapy

Cytokines

Gene polymorphism

## ABSTRACT

The modulation of the immune system following solid organ transplantation has made considerable progress with new immunosuppressive regimens and has considerably improved rejections rates. The improvement in long-term allograft survival is, however, modest. A complex network of cytokines, chemokines, adhesion, activation and co-stimulatory molecules are the frontline contributors to allograft rejection, which in turn determines the evolution of graft function and its long-term survival. Polymorphisms in these genes influence protein levels and presumably their signaling effects. In this review, we present a relevant panel of candidate genes related to the immune system in the context of solid organ transplantation; we discuss the most convincing reports of genetic associations with outcomes in renal transplantation and highlight the most promising loci among the vast body of literature.

© 2015 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

The success of solid organ transplantation depends on many donor or recipient characteristics including HLA mismatch, pre-formed antibodies, age and ethnicity, as well as on specific events linked to the surgical procedure (e.g., cold ischemia time, reperfusion injury). Careful use of immunosuppressants likewise has an impact, and while experience has led to the titration of these drugs to blood levels within thresholds to improve outcomes and avoid adverse effects, there remains unexplained variability in outcomes.

A large body of literature provides evidence that the efficacy and toxicity of immunosuppressive therapy might be mitigated by polymorphisms in important pharmacogenes related to their pharmacokinetics and, to a minor extent, pharmacodynamics. Only a few of the reported associations have translated into validated pharmacogenetic applications. Pharmacogenetics is defined as “the study of variations in DNA as related to drug response”. Variations of interest are non-pathogenic and usually relatively common. Most studies in transplantation have focused on genetic variations that may change the relationship between

the dose of the drug administered and its blood levels. The aim in this context was to obtain additional tools to better achieve or maintain levels in effective and non-toxic concentration targets. Genotyping of cytochrome P450 3A5 (CYP3A5; a key enzyme in tacrolimus hepatic clearance) is an example of routine application that was demonstrated to be beneficial to the refinement of tacrolimus first dose through a randomized multicentre trial [1]. However, the benefit in terms of clinical outcomes for the CYP3A5 specific example, and others, remains to be proven.

Pharmacogenetics of solid organ transplantation is indeed a very particular area: clinical outcomes are influenced by immunosuppressive therapy but additionally by the milieu of immune system players, including cytokines and their receptors, chemokines and their receptors, adhesion molecules, co-stimulatory molecules and innate immune system proteins which are the frontline contributors to rejection (or conversely to immune tolerance). This panel of cytokines provide a long list of less explored candidate genes in the search for polymorphisms that might be used to predict clinical outcomes, and thus tailor therapy based on risk.

Several excellent reviews exist on the topic of genetic polymorphisms in immune system genes and their impact on graft outcomes in solid organ transplantation [2–5]. The following review aims to highlight the loci that have been studied specifically in kidney transplantation related to outcomes of success (acute rejection, graft survival chronic allograft nephropathy, among others), and to present an update

\* Corresponding author at: CHU Limoges, Bâtiment CBRS, Service de Pharmacologie, Toxicologie et Pharmacovigilance, 2 rue du Dr Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France.

E-mail address: [nicolas.picard@unilim.fr](mailto:nicolas.picard@unilim.fr) (N. Picard).



**Table 1**

Genes coding for the main proteins related to the immune response in the context of allograft transplantation.

Chromosome location	Gene	Name	Other names	Main function <sup>a</sup>
<i>Genes related to initial T cell activation</i>				
<i>Co-stimulatory molecules</i>				
2	CD28	CD28 molecule		Binds CD80/86 expressed by antigen-presenting cells to provide a co-stimulatory signal (T-cell activation, proliferation and a proinflammatory response)
3	CD80	CD80 molecule		Downregulates the immune system (acts as an "off" switch by stimulating the CD28 receptor on the T cell)
2	CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	CD152	Mediates a broad variety of immune and inflammatory responses including T cell-dependent immunoglobulin class switching and memory B cell development
20	CD40	CD40 molecule	TNFRSF5	
X	CD40LG	CD40 ligand	CD154, CD40L	
<i>Regulatory molecules</i>				
1	PTPN22	Protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22		Negative regulator of TCR-signal
16	CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator		Master regulator of the HLA class II
<i>Genes related to cytokines and receptors</i>				
2	IL1A	Interleukin-1 alpha (IL-1 $\alpha$ )		Produced by monocytes and macrophages, involved in inflammatory processes and hematopoiesis
2	IL1B	Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )	IL1F2, catobolin	Produced by activated macrophages (as a proprotein), involved in the inflammatory response (cell proliferation, differentiation, apoptosis)
2	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type 1	CD121A, IL1RA	Receptor for interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 receptor antagonist
2	IL1RN	Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA)		Inhibits the activities of interleukins 1, alpha and beta
4	IL2	Interleukin 2 (IL-2)	Lymphokine	Proliferation of T and B lymphocytes
22	IL2RB	Interleukin-2 receptor subunit beta (IL-2R $\beta$ )	CD122	Component of intermediate and high affinity IL2-receptor, involved in endocytosis and transduction of mitogenic signals from IL-2
5	IL3	Interleukin-3 (IL-3)		Potent growth promoting cytokine (mainly hematopoietic cells)
5	IL4	Interleukin 4 (IL-4)		Produced by activated T cells, immunoregulation (differentiation in TH2 cells)
16	IL4R	Interleukin 4 Receptor alpha	CD124	Binds IL-4 (to promote differentiation of Th2 cells) and IL-13 (to regulate IgE production)
7	IL6	Interleukin 6 (IL-6)	IFNB2	Functions in inflammation and the maturation of B cells also capable of inducing fever in people with autoimmune diseases or infections
1	IL10	Interleukin-10 (IL-10)		Produced primarily by monocytes, immunoregulation (differentiation in TH2 cells)
5	IL12B	Interleukin 12, subunit beta (IL12-B)		Expressed by activated macrophages, an essential inducer of Th1 cells development
6	IL17A	Interleukin 17 (IL-17)	CTLA8, IL-17A	T helper 17 (Th17) cells activation
11	IL18	Interleukin 18 (IL-18)	IGIF (IFN $\gamma$ inducing factor)	Augments natural killer cell activity in spleen cells. Stimulates interferon gamma production in T-helper type I cells
4	IL21	Interleukin 21 (IL-21)		Role in both the innate and adaptive immune responses (differentiation, proliferation and activity of macrophages, natural killer cells, B cells and CTLs)
6	TNFA	Tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ )	Cachexin, cachectin	Secreted by macrophages, proinflammatory cytokines (cell proliferation, differentiation, apoptosis)
6	LTA	Lymphotoxin alpha	TNFB (Tumor necrosis factor-beta)	Involved in inflammatory, immunostimulatory, and antiviral response, role in apoptosis, role in formation of secondary lymphoid organs during development
19	TGFB1	Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )		Regulates proliferation, differentiation, adhesion, migration, and other functions in many cell types
<i>Genes related to the innate immune response</i>				
4	TLR2	Toll-like receptor 2	CD282	Role in pathogen recognition and activation of innate immunity
9	TLR4	Toll-like receptor 4	CD284	
3	TLR9	Toll-like receptor 9	CD289	
19	C3	Complement component 3	C3b	Central role in the activation of complement system, antimicrobial activity
5	CD14	CD14 molecule		Expressed on monocytes/macrophages, cooperates with TLRs to mediate the innate immune response to bacterial lipopolysaccharide
<i>Genes related to the effector phase of rejection (graft infiltration and injury)</i>				
4	CXCL8	Chemokine (C-X-C motif) ligand 8	IL8	Chemoattractant for neutrophils, also a potent angiogenic factor
2	CXCR1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1	IL8RA, IL8R1, CD128, CD181	Interleukin 8 receptor (high affinity)
2	CXCR2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2	IL8RB, IL8R2, CD182	Interleukin 8 receptor (high affinity)
17	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1)	Chemoattractant for monocytes and basophils
17	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5)	RANTES	Chemoattractant for blood monocytes, memory T helper cells and eosinophils
3	CCR2	C-C chemokine receptor type 2	CD192	CCL2 receptor
3	CCR5	C-C chemokine receptor type 5	CD195	CCL5 receptor
10	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	SDF1 (stromal cell-derived factor 1)	Ligand of chemokine (C-X-C motif) receptor 4, role in immune surveillance, inflammation response, tissue homeostasis, and tumor growth and metastasis
<i>Other adhesion Molecules</i>				
1	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)	CD106	Leukocyte-endothelial cell adhesion and signal transduction
19	ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)	CD54	Expressed on endothelial cells and cells of the immune system. Binds to integrins of type CD11a or CD11b (CD18)

Table 1 (continued)

Chromosome location	Gene	Name	Other names	Main function <sup>a</sup>
1	<i>SELE</i>	E-selectin	CD62E, ELAM	Found in cytokine-stimulated endothelial cells, accumulation of blood leukocytes at sites of inflammation
1	<i>SELL</i>	L-selectin	CD62L, LAM1, LECAM1	Expressed by leukocytes to facilitate their migration into secondary lymphoid organs and inflammation sites
6	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Vascular permeability factor (VPF)	Facilitates leukocyte infiltration into the inflammation site
<i>Genes involved in allograft injuries</i>				
19	<i>FAS</i>	Fas cell surface death receptor	AP01, CD95, TNFR6	Apoptosis of Fas-positive cells
12	<i>IFNG</i>	Interferon gamma (IFN $\gamma$ )	Type II interferon	Activates of macrophages, induces cytotoxic activities of other cells and apoptosis

<sup>a</sup> Information obtained from the Gene database (NCBI).

of recent reports. We revisit the physiology of the immune system in the context of solid organ transplantation, and highlight important players. We then focus on studies performed with a notable number of cases for the outcome studied, aiming to avoid a common problem in the vast body of literature in this field: underpowered studies that report significant findings without adjustment, and consequent reporting bias of positive findings at specific loci, which in turn often conflict among the totality of positive reports. Among these studies, we highlight promising loci. At present, these require replication, and if confirmed relevant, testing in prospective trials to determine their usefulness as predictive markers.

## 2. Candidate genes

Proteins related to the immune response in the context of allograft transplantation whose genes are subsequently discussed in this review are listed in Table 1. Genes were selected based on association studies related to outcomes of success in renal transplantation. The loci studied are presented in Tables 2 and 3: Table 3 lists the most commonly studied panel of classic cytokine loci, while Table 2 extends the list of genes and presents less commonly studied loci.

### 2.1. Genes related to initial T cell activation

#### 2.1.1. Histocompatibility leukocyte antigens (HLA)

Allograft rejection (and particularly humoral rejection) originates primarily due to HLA mismatch between the donor and recipient. Certain HLA mismatched transplants achieve long term function without evidence of humoral rejection, suggesting differential immunogenicity of HLA mismatches. One explanation might relate to regulators of HLA gene expression. The major histocompatibility complex class II transactivator, a master regulator of the HLA class II, is coded by *CIITA* which contains a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) found to be associated with donor-specific human leucocyte antigen antibody production post-transplantation [6] (Table 3).

#### 2.1.2. Co-stimulatory signals

The immune response leading to allograft rejection involves T cell activation triggered by antigen recognition through the T-cell receptor (TCR). This is reinforced by engagement of co-stimulatory molecules (CD28 and its ligands CD80 and CD86), known as the co-stimulatory signal, or signal 2 [7].

CTLA-4 is a CD28 homologue and is thus a negative regulator of T-cell proliferation signals (i.e. is an anti-proliferative signal) [3]. Several genetic variations in *CTLA4* gene have been tentatively linked to poor clinical outcomes in solid organ transplantation (acute rejection, steroid resistant acute rejection, delayed graft function, see below and in Table 3). Regarding CD28, one study focused on a single polymorphism in relation to acute rejection [8] (Table 3).

Following TCR engagement, the interaction between CD40 Ligand (CD40L, or CD154) and CD40 is the next critical event. CD40 is expressed on antigen-presenting cells and B lymphocytes, whereas CD40L is expressed on T lymphocytes. Their engagement on T lymphocytes induces IL-2 production, followed by evolution of CD8 + T cells into cytotoxic T cells (CTLs). CD40 is also important for B cells, monocyte, macrophage, and leukocyte functions in the context of the immune response [2]. *CD40LG* was investigated as a candidate gene in one study concerning acute renal rejection but no association was found [9].

#### 2.1.3. T cell receptor (TCR) regulators

Certain enzymes serve as negative regulators of T cells. The protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22 (PTPN22) functions as a regulator of TCR-signal transduction by removing phosphate groups from tyrosine residues on intracellular proteins. A specific locus in the *PTPN22* gene has been investigated with respect to long-term allograft failure but no association was found [10] (Table 3).

### 2.2. Cytokine growth factors promoting T cell activation

There are two main sub groups of cytokines driving the expansion and differentiation of CD4 + T Cells in TH1, TH2, TH17 or regulatory T cells: pro- and anti-inflammatory cytokines.

The role of these cytokines in acute rejection or induction of graft tolerance is linked to the balance between TH1 and TH2 cells. TH2 lymphocytes facilitate tolerance by secreting anti-inflammatory IL-4 and IL-10 (inhibiting macrophages activation), whereas TH1 lymphocytes contribute to inflammation by secreting IL-2, IL-12, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and Interferon gamma (IFN $\gamma$ ) [11]. The genes of these cytokines have been the focus of numerous genetic studies in solid organ transplantation: findings are summarized in Tables 2 and 3 and will be addressed in detail later in this review.

IL-2 promotes CD4 + and CD8 + T cells proliferation and differentiation. Its receptor (IL-2R) consists of 3 subunits, which modulate its affinity with IL-2: the high affinity  $\alpha$ -chain subunit (CD25, coded by *IL2RA*); the  $\beta$ -chain subunit (CD122, coded by *IL2RB*) and the common  $\gamma$  subunit.

IL-17A and its homologue IL17F, critical cytokines responsible for Th17 cell reaction involved in inflammation, have been studied as candidate genes in kidney transplantation outcome and several SNPs in *IL17* have associated with outcomes (acute rejection and graft failure) [12–14] (Table 3).

Finally, TNF $\alpha$  is produced by activated macrophages but also by CD4 + T- and NK-cells. It is involved in inflammation, activating endothelial cells, up-regulating cell adhesion molecules and participating of the recruitment of different leukocytes [15]. A specific polymorphism in *TNFA* has been widely tested for association with renal transplant outcomes (Table 2) and will be discussed in detail below. Other loci have likewise been tested (Table 3).



**Table 2**

Classic cytokine polymorphic loci tested for association with renal transplant outcomes. Positive associations were considered as reported by authors.

Gene	Common name	dbSNP	No association	Association
<i>IFNG</i>	+ 874 A/T, UTR5644	rs2430561	[74,47,75,44,70,76,53,71,77-79,33,80-82,68,83,28]	[84,42,72,85-89]
<i>IL10</i>	— 1082 G/A	rs1800896	[40,2,65,90-92,47,27,42,9,45,70,76,93,43,52,71,46,62,63,77,79,85,86,81,82,94,95]	[66,58,96-98,74,84,75,44,72,21,80,73,68,83]
<i>IL10</i>	— 819 C/T	rs1800871	[40,2,96,65,90-92,47,75,27,42,45,70,93,71,46,62,63,77,85,81,82,94,28]	[84,44,21,80,68,83]
<i>IL10</i>	— 592, 571 C/A	rs1800872	[40,2,96,65,90-92,47,75,27,42,45,70,93,43,71,77,78,85,81,82,94,95,28]	[84,44,21,62,80,68,83]
<i>IL1A</i>	— 889 C/T	rs1800587	[40,2,49,75,85,80,81]	
<i>IL1B</i>	— 511 C/T	rs16944	[40,2,75,99,46,85,80,94]	
<i>IL1B</i>	+ 3954, + 3962 C/T	rs1143634	[40,2,75,99,85,100,80,94,28]	[46]
<i>IL2</i>	— 330 T/G	rs2069762	[96,84,75,42,60,101,46,62,64,85,81,89,95]	[102,78,94]
<i>IL4</i>	— 590 T/C	rs2243250	[40,2,90,49,75,93,64,78,85,89,94]	[98]
<i>IL6</i>	— 174 G/C	rs1800795	[40,103,65,90,74,84,75,42,44,45,70,43,52,46,100,80,54,81,94,68,83,28]	[2,47,104,60,21,71,64,85,6,82,89,105]
<i>TGFB</i>	+ 869 C/T, + 29, Leu10Pro, c10	rs1800470	[40,58,2,65,92,47,75,27,44,9,106,70,93,53,46,62,77,78,107,85,86,80,81,89,94,105,83]	[108,109,84,42,59,110,21,111,71,82,68]
<i>TGFB</i>	+ 915 C/C, Arg25Pro, + 74, c25	rs1800471	[40,58,65,98,74,108,92,47,75,27,42,44,9,70,93,53,71,46,62,77,78,85,80,94,105,83,95]	[109,84,59,72,21,106,111,82,28,68]
<i>TNFA</i>	— 308 G/A, TNF 1/2	rs1800629	[40,2,103,90,98,91,74,84,92,47,75,42,9,60,76,43,52,53,77-79,50,85,86,80-82,28,83]	[66,69,58,65,49,67,27,59,44,72,21,101,70,71,46,62,64,63,73,68,61]
[66] Sankaran 1999			[103] Reviron 2001	
[69] Poli 2000			[96] George 2001	
[40] Marshall 2000			[65] Gandhi 2001 (assumed loci based on commercial tray)	
[58] Pelletier 2000			[97] Asderakis 2001	
[2] Marshall 2001			[90] Cartwright 2001	
[98] Poole 2001			[53] Brabcova 2007	
[91] Hahn 2002			[71] Nikolova 2008	
[74] Hutchings 2002			[46] Manchanda 2008	
[108] Iñigo 2003			[62] Grinyó 2008	
[109] Ochsner 2002			[64] Pawlik 2008	
[102] Morgun 2003			[63] Mendoza-Carrera 2008	
[84] McDaniel 2003			[77] Tajik 2006	
[92] Melk 2003			[78] Satoh 2007	
[49] Lee 2004			[107] Cho 2008	
[47] Müller-Steinhardt 2002			[79] Azarpira 2008	
[104] Müller-Steinhardt 2004			[50] Israni 2008	
[75] Uboldi de Capei 2004			[33] Singh 2009	
[67] Wramner 2004			[85] Lobashevsky 2009	
[27] Mytilineos 2004			[6] Martin 2009	
[42] Hoffman 2004			[100] Krajewska 2009	
[59] Park 2004			[86] Omrani 2010	
[44] Alakulppi 2004			[80] Khan 2010	
[110] Chow 2005			[54] Sánchez-Velasco 2010	
[9] Dmitrienko 2005			[87] Crispim 2010	
[45] Loucaidou 2005			[81] Oetting 2011	
[60] Pawlik 2005			[88] Zibar 2011	
[72] Tinkam 2005			[82] Kocierz 2011	
[21] Lacha 2005			[89] Karimi 2012	
[101] Pawlik 2005			[28] Jiménez-Sousa 2012	
[99] Manchanda 2006			[112] Park 2011	
[106] Hueso 2006			[94] Seyhun 2012	
[70] Gendzekhadze 2006			[73] Mandegary 2013	
[76] Azarpira 2006			[68] Dhauadi 2013	
[93] Amirzargar 2007			[105] La Manna 2013	
[111] Li 2007			[61] El-Gezawy 2013	
[43] Alakulppi 2008			[83] Gaafar 2014	
[52] Breulmann 2007			[95] Chen 2014	

Authors, ordered by year published.

### 2.3. Genes related to the innate immune response

Proteins of the innate immune system may affect the longevity of the transplanted organ. Toll Like Receptors (TLRs) may be activated in a variety of circumstances. Ischemia-reperfusion creates a milieu of inflammation in the organ producing “danger signals” that activate TLRs, leading to an increased production of mRNA levels of certain cytokines (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 and IFN $\gamma$ ).

Furthermore, TLR expression of antigen presenting cells (APCs) may regulate the co-stimulatory signal and consequently influence the activation of the antigen-specific adaptive immune response [16]. The TLR family is composed of 11 members, activating different intracellular events through signal transduction: production of cytokines, chemokines and cellular membrane proteins related to the inflammatory responses. TLR4 and its co-receptor CD14, are believed to initiate inflammation and tissue injury by responding to many various ligands (CD14 recognizes bacterial components) [17]. The complement system contributes an important element of the innate immune system, but also plays a role in adaptive immunity: complement component 3 (C3) plays a central role in the activation cascade. Polymorphisms in TLR2, TLR4, TLR9, CD14 and C3 have been tested for associations with kidney transplant outcomes (see Table 3 for references).

Two cytokines involved in the innate immune response and which have been tested for association in renal transplantation are IL-1 and IL-6 (Tables 2 and 3).

The pro-inflammatory cytokine IL-1 exists on two major isoforms: IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , coded by *IL1A* and *IL1B* respectively. IL-1 $\alpha$  is translated into a biologically active form, whereas IL-1 $\beta$  has no biological activity until it is processed by caspase-1.

The IL-1 receptor antagonist, IL1RA (coded by *IL1RN*) is an IL1 signal regulator: it is produced in response to the same stimuli that lead to IL-1 production.

IL-6 has been the focus of numerous association studies (Tables 2 and 3). It is multifunctional, involved in leukocyte trafficking, T-cell proliferation, B-cell differentiation and survival. It is produced by endothelial cells, fibroblasts, monocytes, and macrophages in response to different stimuli during systemic inflammation (including IL-1, IL-17 and TNF $\alpha$ ).

### 2.4. Genes related to the effector phase of rejection (graft infiltration and injury)

#### 2.4.1. Genes related to the graft infiltration

The infiltration of leukocytes into the site of tissue damage is an important part of the allograft rejection process. Extravasation of leukocytes from the blood to the site of inflammation is regulated by several protein families, including selectins, integrins, chemokines and chemokine receptors, whose expression is upregulated at the site of inflammation.

The interaction between selectins is the first step in the contact between the leukocyte and the blood vessel, allowing to the rolling of the immune cell along the vascular endothelium at the inflammation area. Endothelial cells express E-selectin (coded by *SELE*), while leukocytes express L-selectin (coded by *SELL*). Two groups explored the influence of the variability in *SELE* and *SELL* on acute renal rejection [18,19] (Table 3).

Subsequent interaction between chemokines and their receptors induces strong adhesion of leukocytes with endothelial cells.

The different roles and involvement of chemokines and their receptors in kidney diseases have been reviewed by Panzer and colleagues [20]. Two main families will be discussed here: the C–X–C and the C–C chemokine family (whose genes cluster at chromosome 14 and 17 respectively). Each chemokine has different primary target cells. For example, CCL2 (also known as MCP-1) targets monocytes, T cells, basophils, and natural killer (NK) cells, whereas CCL5 (also known as RANTES) targets eosinophils or basophils. The genetic variability of

these chemokines and their receptors has been studied in the context of deterioration of graft function (CCL5 and CCL2) [21], recurrent acute rejection (CCL5) [22] and premature kidney graft failure (CCL2) [23] (see Table 3).

Genes coding for Intercellular Adhesion Molecule 1 (*ICAM1*) and vascular cell adhesion molecule-1 (*VCAM-1*) have also been identified as candidates and explored (see Table 3 for references).

In addition to its well known role in vasculogenesis and angiogenesis, vascular endothelial growth factor (VEGF) contributes to the local inflammatory processes that facilitate leukocyte infiltration. Several authors have investigated *VEGFA* as a candidate gene in the context of kidney transplantation (see Table 3 for references).

#### 2.4.2. Genes involved in allograft injuries

Allograft destruction by activated T cells occurs via two major cytotoxic mechanisms: the release of perforin/granzyme in cytoplasmic granules of CD8 + CTLs and NK cells, and through the Fas/Fas ligand system in CD4 + CTLs. Activated macrophages, neutrophils and eosinophils contribute additionally.

The binding of Fas to its ligand (FasL) results in trimerization of Fas and apoptosis of Fas-positive cells. Increased expression of cell-surface Fas has been observed in acute rejection [24]. At least one study has investigated FAS as a candidate gene in kidney transplantation (Table 3).

IFN $\gamma$  is produced by both adaptive and innate immune cells (e.g. NK cells, NKT cells, macrophages, myelomonocytic cells, TH1 cells, cytotoxic T lymphocytes, and B cells) and has distinct roles: on the one hand, it promotes the development of the TH1 response, regulates MHC class I, II and antigen presentation. On the other hand, it activates macrophages, the cytotoxic activities of other cells, and induces apoptosis [25]. It may contribute to the severity of the rejection episode by stimulating neopterin by monocytes derived macrophages, which are also effectors of tissue damage in the acute rejection process [26]. Association studies with this gene are reported in Table 2 and discussed below.

### 3. Association between genetic variation in immune response-related genes and outcomes in kidney transplantation

A very large number of short genetic variations (mostly SNPs and short insertion/deletions) in the above-mentioned genes have been studied in the context of success of the kidney allograft. In most cases those polymorphisms have been purported to have functional consequences, however these are likely to be context specific. Many candidate polymorphisms have been ascribed phenotypes and inheritance models based on specific in vitro or in vivo scenarios, which may not be relevant in the context of solid organ transplantation.

Much of this work in determining polymorphism candidates was performed prior to the Human Genome and HapMap Projects and has led to a vast body of work using the same loci: this work continues despite the opportunities that these projects provide, and the choice of candidate polymorphism to represent these justified candidate genes might not be optimal. Furthermore, even if some of the polymorphisms in these candidate loci do indeed have functional and measurable consequences, for the most part, at present, none that have been replicated have emerged to impart an effect size that would lead to a clinical consequence with utility as a marker to predict outcomes. Below we focus on studies with a large number of cases for the phenotype studied: we arbitrarily chose approximately 100 cases as a threshold. This arbitrary choice reflects a number we thought was substantial. More precise calculations based on power depend on the minor allele frequency of each variant (which differs between loci) and some idea of effect size (which is often unknown), thus would be difficult to achieve.

Table 2 lists the genetic variations most commonly investigated. They are located in a panel of 9 genes. Table 3 lists the less commonly studied loci.



### 3.1. Positive associations in kidney transplant recipients

Perhaps the largest cohort in a single publication to-date involved 2298 primary transplant recipients and 1901 repeat transplants [27].

Of the primary transplant recipients, there were presumably 237 cases of graft failure after the first year, and of the repeat transplant 288, though these numbers were extrapolated from the presented percentages of graft survival and may not be exact due to censorship for death. Nonetheless, this represents a very large number of cases among published reports on this topic. This work was performed by the Collaborative Transplant Study group, an international registry. Only Caucasian participants were included, and all genotyped loci

exhibited Hardy–Weinberg equilibrium. The authors grouped patients into presumed phenotypes of cytokine expression levels based on *IL10* haplotypes (comprising three SNPs: rs1800896 (–1082), rs3021097 (–819) and rs1800872 (–592)), two *TGFB1* SNPs in codon 10 (rs1800470; c10) and 25 (rs1800471; c25), one SNP in *TNFA* (rs1800629; –308) and one in *IL4R* (rs1801275; +1902).

No associations between the different presumed phenotypes and graft survival were found in first transplant recipients for the loci tested ([27] in Tables 2 and 3). Repeat transplant recipients with the *TNFA* rs1800629 (–308) A/A “high producer” genotype presented lower graft survival. This was significant at both 1 and 3 years post-transplant following correction for multiple testing in univariate

**Table 3**

Polymorphic loci in immune system genes, studied with respect to outcomes of success in the context of kidney transplantation. Positive associations were considered as reported by authors. Common names of loci are listed as reported by authors. All attempts were made to accurately retrieve rs identifiers for loci in order to consolidate reports.

Common name	dbSNP	No association	Associations
<i>Cytokines and receptors</i>			
IL1R1 –970 C/T			[45]
IL1R1 pst1 1970 C/T	rs2234650	[40,2,75,85,80]	
IL1RA 86 bp VNTR			[99]
IL1RN mspa1 11100 T/C	rs315952	[40,2,75,85,80]	
IL1RN VNTR 240/410 (intron 2)		[46]	
IL1RN A/G	rs2234676	[28]	
IL1RN C/T	rs419598	[28]	
IL2 + 166 G/T	rs2069763	[75,62,85,112]	[94]
IL2–IL21 intergenic	rs6822844	[113]	
IL2RB c.1173C/A	rs228942	[95]	[112]
IL2RB c.750C/T	rs228953	[95]	[112]
IL3 C132T, Pro27Ser	rs40401		[114]
IL3 (–1107 from 5'UTR)	rs181781		[114]
IL3 (–1484 from 5'UTR)	rs2073506		[114]
IL4 1098 T/G	rs2243248	[75,93,33,28,83]	
IL4 33 T/C	rs2070874	[33,28,83]	[75,93]
IL4 VNTR B1B1/B2B2		[46]	
IL4R + 1902 G/A, Q576R Gln/Arg	rs1801275	[40,2,75,27,85,28]	
IL6 – 572 G/A	rs1800796	[28]	[104]
IL6 – 597 G/C	rs1800797		[104]
IL6 + 565 G/A, nt565	rs1800797	[75,28,33,83]	
IL6 3247 G/A		[40]	
IL8 –251 A/T	rs 4073		[33]
CXCR1 –2668 G/A	rs2671222		[18]
CXCR2 –8939 C/T	rs4674258	[18]	
CXCR2 1208 T/C	rs 1126579	[18]	
IL10 A	rs3024493	[50]	
IL10 A	rs1554286	[50]	
IL10 A	rs2222202	[50]	
IL10 C	rs3024498	[50]	
IL10 C	rs1878672	[50]	
IL10 G	rs3021094	[50]	
IL10 T	rs3024494	[50]	
IL10 –851 C/T	rs1800894	[62]	
IL10.G microsatellites			[115] (G12)
IL10.R microsatellites		[115] (G12)	
IL12B –1188 A/C	rs3212227	[75,78,80,26,116]	[85]
IL17 –197 A/G	rs2275913	[12]	
IL17F 6329 G/A	rs766748	[13]	
IL17F –1507 G/A	rs1889570	[13]	
IL17F 7384 A/G	rs2397084	[13]	
IL17F 7470 G/A	rs11465553	[13]	
IL17F 7489 A/G	rs763780		[13]
IL18 –137 G/C	rs187238	[117]	[30,118]
IL18 –607 C/A	rs1946518		[30,117]
IL21 5250 C/T	rs4833837	[12]	
IL21 + 1472 G/T	rs2055979	[12]	
IL23R c.309 C/A	rs10889677		[12]
TNFA –1031, –1032 T/C	rs1799964	[59,45]	
TNFA –238 G/A	rs361525	[40,2,75,27,59,78,85–87]	
TNFA –857, –859 C/T	rs1799724	[59,45]	
TNFA –863, –865 C/A	rs1800630	[59,45]	
TNFA +488 A/G		[2,40]	
TNFA A	rs3091257	[50]	
TNFA a microsatellite			[96] (a9), [119] (a9)
TNFA d microsatellite			[119] (4)

Table 3 (continued)

Common name	dbSNP	No association	Associations
TNFA G	rs3093662	[50]	[50] (uncorrected)
LTA 249 A/G (intron 1)	rs909253	[2,40]	
LTA 365 C/G (intron 1)	rs746868	[2,40]	
LTA 720 C/A (exon 3)	rs1041981	[2,40]	
TGFB1 – 509 C/T	rs1800469	[2,40,78,107]	[108]
TGFB1 – 880 G/A		[2,40]	
TGFB1 – 800 G/A	rs1800468	[108]	
TGFB1 A	rs1800472	[50]	
TGFB1 C	rs1982073	[50]	
TGFB1 C-del (deletion)		[46]	
TGFB2 C/G promoter	rs764522		
TGFB2 G/A promoter	rs3087465	[120]	
TGFB2 Asn389Asn (exon 3)	rs2228048	[120]	
IFNG 12bp microsatellite	rs3138557	[58,90,9]	[97] (12CA), [63] (12CA)
<i>Chemokines and receptors</i>			
CCL2 (MCP-1) – 2518 G/A	rs1024611	[61,53]	[21,23,121]
CCL2 C/T	rs4586	[28]	
CCL5 (RANTES) – 109 T/C		[53]	[21]
CCL5 (RANTES) – 28 C/G	rs2280788	[21,53,22]	
CCL5 (RANTES) – 403 G/A	rs2107538	[21,53,28]	[22]
CCL5 (RANTES) In1.1 T/C (intron 1)	rs2280789	[22]	
CCR2 V64I, +190G/A, +/64I	rs1799864	[53,23,42,121,122]	[33,34,37,19,123,36]
CCR5 – 32, delta32, Δ32	rs333	[53,33,34,37,35,19,123,122,36]	[87,32]
CCR5 – 59029 A/G		[19,123,36]	[34,42,37,35]
CXCR4 C/T	rs2228014	[124]	
CX3CR1 V249I		[34]	
CX3CR1 T280M		[34]	
SDF1 G/A	rs1801157		[124]
<i>Co-stimulatory molecules</i>			
CTLA4 – 1147 C/T	rs16840252	[125]	
CTLA4 +9 A/G, Thr17Ala	rs231775	[9,10]	[70,125,126]
CTLA4 – 1661 A/G	rs4553808	[70]	
CTLA4 – 1722 T/C	rs733618	[70]	
CTLA4 – 318 C/T	rs5742909	[9,70,125]	
CTLA4 (AT)n (exon 3) 22 alleles		[127]	
CD28 + 17 T/C IVS3	rs3116496		[8]
CD40LG 21–27 bp microsatellite		[9]	
<i>Adhesion molecules</i>			
ICAM1 G/A exon 6		[19]	
ICAM1 R241G, Gly152Arg	rs1799969	[63,87,28]	
ICAM1 A/G E469K, Lys469Glu	rs5498	[63,87,28]	[128]
ICAM1 G/R (exon 4)		[19]	
VCAM1 T/ C	rs3170794	[128]	
VCAM1 T/ C	rs1041163	[128]	
SELE 1402 C/T, His468Tyr	rs5368	[18]	
SELE G/T (exon 2)		[19]	
SELE 128 S/R, Ser149Arg (exon 4)		[19]	
SELE 554 L/F, Leu575Phe (exon 11)		[19]	
SELL – 206 F/L, Phe206Leu	rs1131498	[19]	
SELL – 642 A/G	rs2205849	[18]	
<i>Innate immune system</i>			
C3 Arg80Gly, S/F			[51]
TLR2 A/T (– 16934)	rs4696480	[28]	
TLR4 C/T (Thr397Ile)	rs4986791	[28]	
TLR4 D299G, Asp299Gly		[129,17]	[130,131]
TLR4 T399I, Thr399Ile		[129]	[130,131]
TLR9 – 1486 T/C	rs187084		[132]
TLR9 2848 G/A	rs352140	[132]	
CD14 – 159 C/T		[17]	
CD14 – 260 T/C	rs2569190	[133]	
<i>T-cell activation/regulation</i>			
CIITA – 168 A/G	rs3087456	[6]	
CIITA 1614 G/C	rs4774		[6]
PTPN22 1858 C/T	rs2476601	[10]	
<i>Other</i>			
FAS -670 G/A		[105]	
PTPRC (CD45) 77 C/G (exon 4)	rs17612648	[9]	
VEGFA – 1154 A/G	rs1570360	[31]	[29,30]
VEGFA – 2578 C/A	rs699947		[28,29,31,30]
VEGFA – 460 T/C	rs833061	[28]	
VEGFA – 7 C/T	rs25648	[31]	
VEGFA 936 C/T 3'UTR			[39]

analyses. Significance was maintained in HLA-DRB1 mismatched recipients (1–2 mismatches,  $n = 1045$ ) but not in matched recipients ( $n = 46$ ).

In multivariate Cox regression analysis the *TNFA* rs1800629 (–308) A/A “high producer” genotype was associated with relative risk of 1.96 (95% CI: 1.23–3.11;  $p = 0.0047$ ), presumably after the first year, and remained significant by the third year. *TGFB1* “high producer” haplotype, versus “intermediate” and “low producer” haplotypes combined presented higher transplant survival, but only after the first year. In the Cox model this represented a relative risk of 1.49 (95% CI: 1.15–1.92;  $p = 0.0026$ ). The authors acknowledge the limitation of working with data from a large registry, and that testing clinical outcomes such as acute rejection or delayed graft function is difficult as they are unverifiable: for this reason graft survival with censorship for loss to follow-up was the approach taken. Furthermore, details of variables, including acute rejection and delayed graft function, would not have been included in multivariable analyses for graft survival.

Jiménez-Sousa and colleagues explored chronic renal allograft dysfunction, defined as  $\geq 30\%$  of the inverse of creatinine after the third month of transplantation, versus the highest value of the first three months (158 cases; 118 controls) [28]. Thirty-eight loci in 10 immune related genes were genotyped ([28] in Tables 2 and 3). The loci were primarily in promoter regions, and were included if functional consequences could be determined using a variety of in silico methods. They found three significant associations, following exploration of possible genetic models of inheritance, and adjusted findings in multivariable analysis.

*TGFB1* rs1800471 (G/C versus G/G) and *VEGFA* rs699947 (A/C–A/A versus C/C) associated with an increased risk of chronic renal allograft dysfunction (OR = 2.65, 95% CI: 1.09–6.47;  $p = 0.025$  and OR = 1.80, 95% CI: 1.02–3.20;  $p = 0.044$ , respectively).

Correction for multiple testing was performed by the Stratified False Discovery Rate software. *VEGFA* rs699947 has been found to associate with other kidney transplant outcomes in smaller cohorts and with varying methodologies in analyses among reports (acute rejection: [29,30]; graft survival: [31]; see Table 3). These authors did not apply corrections for multiple tests.

Fischereder et al. report improved graft survival in *CCR5*  $\Delta 32$  (i.e. a deletion of 32 nucleotides in *CCR5*; rs333) homozygous carriers compared to heterozygotes and non carriers: only one of 21 (4.7%) individuals lost their graft in the follow up period, compared to 87 of 555 in the other group (15.7%) (HR = 0.367, 95% CI: 0.157–0.859; log-rank  $p = 0.033$ ) [32] (see Table 3). However, from the Kaplan–Meier plot presented it is clear that a substantial proportion of both groups are not represented in data beyond 5 years of follow up, and at this time point it is difficult to tell whether the difference in graft survival between the groups would have been significant.

It also raises the question whether bias occurred in following the known *CCR5*  $\Delta 32$  homozygous carriers more closely compared to larger cohort. The frequency of rejection episodes was similar between the two groups. The deletion is rare and several groups reporting lack of associations did not detect homozygous carriers [17,33–37] (Table 3).

Oetting et al. performed a validation study for frequently 21 reported loci (see Tables 2 and 3 for loci related to the immune genes) [38]. A total of 585 patients were genotyped, and there were 98 cases of acute

#### Notes to Table 3:

Authors from Table 2 that tested additional loci are included here using the same order. Additional reports are from the following authors:

- [113] Asano 1997.
- [114] Kobayashi 1999.
- [32] Fischereder 2001.
- [29] Shahbazi 2001.
- [34] Abdi 2002.
- [23] Krüger 2002.
- [42] Hoffmann 2004.
- [115] Vildický 2004.
- [31] Lemos 2005.
- [116] Ducloux 2005.
- [51] Brown 2006.
- [117] Palmer 2006.
- [118] Kolesar 2007.
- [22] Krüger 2007.
- [119] Nogueira 2007.
- [37] Yigit 2007.
- [39] Günesacar 2007.
- [26] Chin 2008.
- [120] Kang 2008.
- [121] Kim 2008.
- [122] Hoffmann 2009.
- [35] Cha 2009.
- [123] Kim 2010.
- [124] Krichen 2010.
- [125] Lee 2010.
- [18] Ro 2011.
- [19] Krichen 2011.
- [126] Lee 2011.
- [127] Gorgi 2011.
- [30] Mittal 2011.
- [128] Azmandian 2012.
- [36] Firasat 2012.
- [129] Domański 2012.
- [12] Karimi 2014.
- [130] Kim 2013.
- [10] Kłoda 2013.
- [131] Kłoda b 2013.
- [132] Kim b 2013.
- [17] Krichen 2013.
- [133] Kwiatkowska 2014.
- [13] Park 2014.
- [8] Pawlik 2014.



rejection in the first 12 months post-transplantation. Loci were tested at three time-points to acute rejection (1 month, 6 months 12 months).

The authors make a case against correction for multiple testing, and instead applied a sum of squared score test, however this approach permits a *p* value threshold of 0.0615 and is unconvincing. For immune related genes, *CCR5* Δ32 associated with acute rejection at six months only. While Fischereder et al. report a protective effect of this deletion for homozygous carriers (Del/Del), Oetting et al. grouped heterozygous and homozygous carriers (Wt/Wt versus Wt/Del or Del/Del, OR = 2.33, 95% CI: 1.08–5.02; *p* = 0.0316). Both findings are in the same direction for a protective effect of the variant (Δ32) allele.

Gunesacar et al. genotyped the single SNP *VEGFA* rs3025039 (reported as +936 C/T), located in the 3' untranslated region in cases who had lost their graft in the first year post-transplant, and controls with a well functioning graft at the same time point (*n* = 265 cases, *n* = 290 controls) [39]. Subjects were sourced from the Collaborative Transplant Study bio-bank, were Caucasian and were all primary kidney recipients receiving deceased donor kidneys.

A protective effect was detected among heterozygotes at this locus (OR = 0.57, 95% CI: 0.35–0.91; *p* = 0.019). A dose effect was not evident among TT carriers, but may be due to lack of power.

### 3.2. Positive associations in donor and recipient cohorts

Marshall et al. analyzed 22 polymorphisms in 11 cytokine genes in kidney transplant recipients (114 cases, 95 controls) [40] and 20 polymorphisms in 11 genes in cadaveric donors (77 cases, 68 controls) [41] (see Tables 2 and 3).

The phenotype considered was presence or absence of acute rejection in the first 30 days post transplantation: although this phenotype is somewhat limited and only applicable to the immediate post transplant period, the large number of cases defined by strict clinical criteria give weight to the findings, though the results are not generalizable. To cover the large number of tests considering various genetic models and haplotype combinations, the authors applied a two-set approach as a correction. No associations were found for recipients. In donors, however, the *IL6* promoter SNP rs1800795 (known as −174) associated with acute rejection (C/C vs G/C and G/G genotypes: OR = 8.67; *p* = 0.0002). This finding was significant regardless of HLA mismatch grouping. The two-set approach affirmed relevance in the context of multiple testing. In sub-group analyses steroid responsive rejections maintained significance, however steroid resistant rejection demonstrated an elevated degree of risk (compared to no rejection; cases = 33, controls = 68; OR = 15.96; *p* = 0.00007). Fifty-six donors provided kidneys to two distinct recipients: for the primary analysis one recipient was included and selected in a random fashion. The 56 remaining recipients allowed testing of the outcome to determine a positive predictive value in an independent, albeit small, group: the finding remained significant (PPV = 78%; *p* = 0.02).

The *IL6* rs1800795 (−174) C allele is reported to correspond to decreased IL-6 secretion, however the authors argue that linking genotype to *in vivo* phenotype is not straight forward, especially given its pleiotropic effects. They present an interesting set of arguments, but what is clear is that the finding is compelling.

Other authors that have tested this locus in donors did not find an association for acute rejection (see Table 2) in relatively large (>100 cases) [42,43] or in smaller [44–46] studies, thus it may be specific for the immediate post-transplant period, and for solely cadaver donors. Despite a small case number for the phenotype studied (*n* = 39, graft loss), Müller-Steinhardt and colleagues had complete 3 year data for their cohort of 158 kidney recipients [47]. They found *IL6* rs1800795 (−174) C allele carrying recipients (C/C–G/C) were at an increased risk (Bonferroni corrected *p* = 0.047). When this group re-examined their data testing additional *IL6* promoter polymorphisms (rs1800797: −597, rs1800796: −572) the risk estimate was strengthened:

individuals homozygous for the wild-type allele at all three loci (G–G haplotype) exhibited superior graft survival at three years. Those with a mutant allele at any locus were at an 8-fold increased risk (95% CI: 1.8–34.6; *p* = 0.006).

Experimental data for the functional consequence of these loci demonstrates a complex scenario, and that genotyping *IL6* rs1800795 (−174) alone might miss the bigger picture [48]. Marshall et al. note that rs1800795 is located near two steroid response elements, and hence may influence outcomes in a context specific manner [40].

The effect size of *IL6* SNPs seems notable and replication in an appropriate sized cohort might prove worthwhile to determine if this locus will be a clinically useful predictive marker.

Lee et al. tested three loci *IL1A* rs1800587 (−889 C/T), *IL4* rs2243250 (−590 C/T), *TNFA* rs1800629 (−308 G/A) (recipients: cases = 140, controls = 137; cadaveric donors: 122 = cases, 111 = controls) [49]. Cases were defined as having at least one acute rejection episode in the first post-transplant year, while controls had no such events in the first year. No associations were found for any of the loci. Sub-group analyses among HLA-DR mismatched transplants revealed *TNFA* rs1800629 (−308) A allele, only among donors, conferred an increased risk for rejection (cases = 75, controls = 45; RR = 1.4, *p* = 0.0395): a two-set approach was used to account for multiple testing.

Israni et al. constructed an impressive cross-sectional cohort comprising 616 recipients from the Delaware Valley region, and 349 recipients receiving the contralateral kidney identified through the United States Renal Data System (USRDS) registry [50]. The total cohort comprised 965 recipients and 512 donors. The phenotype examined was delayed graft function, defined as requiring dialysis in the first week post-transplant (up to 326 events were analyzed, depending on the loci tested). While most authors select candidate polymorphisms based on literature reports, this group attempted a tagging approach when possible, and aimed for loci with a minor allele frequency > 10% (number of loci per gene: *HMOX1*: 9, *IL10*: 7, *TNFA*: 3, *TP53*: 7, *TGFB1*: 2). *TGFB1* loci were selected based on reported functional consequence (*HMOX1* and *TP53* are apoptosis related genes). Only donors were genotyped: 256 donors contributed both kidneys (representing 512 recipients in the final analysis). Of these, 57% of recipient pairs had concordant outcomes: the authors report this as unexpected due to chance (*p* = 0.004, binomial exact test).

*TNFA* rs3093662 G versus A allele associated with delayed graft function following multivariable analysis (OR = 1.85, 95% CI: 1.16–2.96; *p* = 0.01), however this did not hold when a correction for multiple testing was applied.

Brown et al. genotyped the complement *C3* rs2230199 SNP (Arg<sup>80</sup>Gly), designated Slow (S) and Fast (F) respectively, for the difference in electrophoretic motility imparted on the protein due to the amino acid change, in 513 pairs of Caucasian donors and recipients [51]. Donor genotypes proved of importance, but only when recipients did not carry the mutant allele: kidneys from donors with *C3* S/S versus *C3* F/F or F/S genotypes exhibited improved graft survival (hazard ratio = 2.21, 95% CI: 1.04–4.72; *p* = 0.04).

Other notable cohorts, exhibiting a large number of cases of the phenotype tested and where donors were genotyped include the ones from Hoffmann et al. [42] (donors only, loci in *IL2*, *IL6*, *IL10*, *TNFA*, *TGFB1*, *IFNG*, *CCR2*, *CCR5*; Tables 2 and 3) and Firasat et al. [36] (donors and recipients, loci in *CCR2* and *CCR5*; Table 3), however both papers suffer poor reporting or lack of strategy to address multiple testing. Hoffmann et al. genotyped 12 loci in 244 donors and report associations between *TGFB1* codon 10 variant (rs1800470) and *CCR5* rs1799987 (59029G/A) and acute rejection (approximately 109 episodes; *p* = 0.027 and *p* = 0.039 respectively) and *IFNG* rs2430561 (+874A/T) and biopsy-proven chronic allograft nephropathy (*p* < 0.008) [42]. The authors report applying a Bonferroni–Holm correction with Fisher's exact test in the methods, however the results that are reported used chi-square, linear regression and Kaplan–Meier methods and it is unclear how multiple testing was ultimately accounted for.



Firasat et al. genotyped up to 606 pairs donors and recipients ( $n = 157$  episodes of rejection, biopsy proven) and report the G/G wild type genotype of *CCR2* rs1799864 ( $V^{64I}$ ) in recipients to be associated with rejection (OR = 2.14, 95% CI = 1.2–3.7,  $p = 0.009$ ); correction for multiple testing was not addressed [36].

### 3.3. Large cohorts with no associations at loci tested

We applied similar criteria for reports on lack of association, namely a large number of cases and a strategy to address multiple tests. Dmitrienko et al. analyzed loci in *CTLA4*, *TGFB1*, *IL10* or *TNFA*, and dinucleotide repeat polymorphisms in *IFNG* and *CD40L*, in 100 acute rejection cases, and 100 rejection free renal transplant recipients (Caucasian first kidney recipients, for events occurring in the first post-transplant year; Tables 2 and 3) [9]. No associations were found with acute rejection for single loci or allelic analyses for dinucleotide repeats in multivariable analyses. Associations with the *CD40L* -147 allele (rs not reported) and *TGFB1* c25 (rs1800471) and graft failure, a secondary outcome measure, require confirmation as the authors report, particularly as this phenotype was not used for constructing the case control cohort. Breulmann and colleagues genotyped *IL10* rs1800896 (–1082), *TNFA* rs1800629 (–308), *IL6* rs1800795 (–174), grouping by predicted phenotypes at two levels, in a large cohort (224 consecutive patients, rejection cases = 115, graft failure = 33) and found no significant associations with rejection [52] (Tables 2 and 3). Alakulpipi et al. typed *TNFA* rs1800629 (–308), *IL10* rs1800872 (–592), rs1800896 (–1082) and *IL6* rs1800795 (–174), as well as other loci in genes with a functional role in thrombogenesis (total of 11 loci, see Tables 2 and 3 for immune genes) [43]. They included 772 recipients, and 462 donors; the number of cases with rejection was 122.

Correction for multiple testing was applied and no locus was found associated with rejection, or the other clinical outcomes tested, for neither donors nor recipients. Brabcova and colleagues typed 9 loci in immune system genes *TNFA* rs1800629 (–308), *CCL2* rs1024611 (–2518), *CCL5* rs2107538 (–403), –109 (no rs reported) and rs2280788 (–28), *CCR2* rs1799864 (+190G/A), *IFNG* rs2430561 (+874A/T), *TGFB1* rs1800470 (c10) and rs1800471 (c25) (total number of recipients = 436; chronic allograft nephropathy cases = 122, cases with sub-clinical rejection = 38, acute rejection cases = 190), and found no associations [53] (Tables 2 and 3). Sánchez-Velasco and colleagues genotyped *IL6* rs1800795 (–174) in 335 kidney recipients (cases of acute rejection = 133, cases of chronic allograft nephropathy = 115) and found no associations [54] (Tables 2 and 3).

### 3.4. Meta-analyses of published associations

To make sense of this vast body of literature, several authors have performed meta-analyses at the most frequently studied loci.

Thakkinstian and colleagues attempted to achieve individual patient data for their meta-analysis in the kidney transplant setting by petitioning authors [55]. Five of 13 invited authors collaborated: these thirteen papers had passed pre-determined selection criteria. There was sufficient data to explore the effect of *TGFB1* rs1800470 (c10) (data representing 5 studies; 334 cases/325 controls), *TGFB1* rs1800471 (c25) (4 studies, 234 cases/205 controls), *TNFA* rs1800629 (–308) (4 studies, 350 cases/427 controls), *IL10* rs1800896 (–1082; 3 studies, 122 cases/117 controls) on transplant outcome. 'Poor outcome' was a composite of acute graft rejection, chronic allograft nephropathy, graft failure and chronic graft rejection thus muddying analyses. No association was found with any of these polymorphisms in univariate analyses.

Age  $\geq 45$ , and  $\geq 3$  HLA mismatches associated with poor outcomes: a fixed-effect logistic model including these covariables revealed that *TGFB1* rs1800470 (c10) T/C vs T/T genotype increased risk, OR 1.5 (95% CI: OR: 1.0–2.2;  $p = 0.034$ ; 325 cases, 334 controls). No effect on risk was found when C/C was compared to T/T carries making interpretation of this finding difficult (Cochrane Armitage test for trend, lack of

dose effect despite a substantial number of CC heterozygotes). For *IL10* rs1800896 (–1082), this group included ORs from three additional studies to the individual patient data, achieving 352 cases and 302 controls. With and without adjustment for age and HLA mismatches, there was no significant association at this locus, however the authors report a trend: a minor dose effect can be observed, but is likely due to chance. Correction for multiple testing was not reported. Significant findings were reported for haplotype analyses of *TGFB1* and *IL10*, but are unconvincing.

Wu et al. performed a meta-analysis of loci in the *IL4* gene, limiting to studies reporting acute rejection, and explored various modes of inheritance (multiplicative model, Cochrane Armitage test for trend, dominant and recessive models) [56]. Pooled analyses (including heart, liver and kidney transplant) revealed no association for recipient *IL4* rs2243250 (–590 C/T) (492 cases and 721 controls; 7 studies of kidney, 2 of liver and 1 of heart transplants); recipient *IL4* rs2070874 (–33C/T) (98 cases and 220 controls; 2 studies in kidney, 1 in liver); and donor *IL4* rs2243250 (–590 C/T; 298 cases and 390 controls; in kidney ( $n = 4$  studies) 4 and heart ( $n = 1$ ) transplants). No significant associations emerged in sub-group analyses by ethnicity (Asian and Caucasian). Most of the data represented kidney transplant recipients, and there were no significant findings for these SNPs.

*IL4* rs2243250 (–590 C/T) was associated with acute rejection of liver transplants (T/T + C/T vs. C/C; OR = 0.36, 95% CI 0.14–0.90; 77 cases, 152 controls). The  $p$  value for this association is not reported, but rather a  $p$  value for heterogeneity, which the authors deem acceptable. At the same time, it is not clear whether corrections for multiple testing were applied.

Ge and colleagues performed a meta-analysis of studies involving *TGFB1* c10 (rs1800470) and c25 (rs1800471) loci and acute rejection [57]. Among kidney transplant recipients (9 studies, 123 cases, 301 controls) there was no association for purported intermediate versus high production phenotypes. The significant findings reported globally were influenced by two studies in heart transplant recipients.

### 3.5. Notable associations: *TNFA* rs1800629 (–308)

In Table 2 of the most frequently studied loci, the balance between positive reports and negative reports of association largely favors the negative side. The exception is *TNFA* rs1800629 (–308). Associations have been found between this SNP and numerous outcomes in donors and recipients: acute rejection, recipients [21,44,46,58–63]; graft survival, recipients [27,64]; graft survival, donors [65]; associations in sub group analyses, recipients [66–68], associations in sub group analyses, donors [49]; associations with other phenotypes/multiple phenotypes [69–72]; donors: [73] (see Table 2).

Majority of reports of association implicate the *TNFA* rs1800629 (–308) A allele in acute rejection. While studies with a substantial number of cases found no association with the phenotypes tested [41, 43,52,53], Mytilineos and colleagues found an almost doubled risk for graft loss in cadaver kidney recipients, but not in primary kidney recipients, independent of HLA mismatching, and in a large Caucasian cohort [27]. In situations where *TNFA* rs1800629 (–308) has associated with an outcome in HLA mismatched subgroups, donor type may have been a primary reason.

Some authors report synergy for combinations of loci in *TNFA* and *IL10* in recipients: the original paper from Sankaran et al. is frequently reported and derives from an analysis in a cohort of 100 recipients and donors, where a large proportion received treatment for rejection [66]. The authors group controls as 0 or 1 rejection episode ( $n = 74$ ), and cases as 2 or more ( $n = 21$ ). All significant findings were in subgroup analyses, and in recipients only, and although justified by physiologically plausible explanations, there was no apparent correction for multiple testing. Marshall et al. did not corroborate these combinations in a larger cohort [40].



In their excellent review of cytokine gene polymorphisms and their functionality, Smith et al. present a case that the *TNFA* rs1800629 (–308) might not have a functional consequence, and might instead be a marker in linkage disequilibrium [48]. While there are numerous *TNFA* promoter polymorphisms, the authors present the possibility through reports of interesting experimental work that the functional polymorphism might even occur in the nearby *LTA* gene. If this locus does indeed represent a different functional polymorphism in *TNFA* or a nearby gene, ethnic origin is crucial and may be one of the reasons for discrepancies in findings.

#### 4. Conclusion

The literature dedicated to determining associations between kidney transplant outcomes and genetic polymorphisms in immune system genes suffers from positive reports of associations, often from underpowered studies, which might in turn represent publication bias. We have attempted to highlight interesting findings from studies with a large number of cases, which typically have addressed the issue of multiple testing.

The role of the immune system in the context of transplant medicine in events such as acute rejection, delayed graft function, chronic allograft dysfunction and graft survival, among others, is complex and involves many genes. Of these, many are polymorphic, and there is a possibility that multiple loci have functional consequences. Strategic selection of loci may help to better interrogate candidate genes, for example tag-SNP approaches involving loci with a minor allele frequency greater than a threshold percentage, or in silico approaches in determining promoter and splice site variants. Typically these genes are highly conserved, with very few examples of polymorphisms influencing the protein sequence. Grouping rare SNPs in association studies might help to address the issue of rarity for loci that have a confirmed functional effect. However, multiple rare SNPs might not necessarily appear in individuals so as to affect the effect size in an incremental way.

The event outcomes are complex phenotypes and likely have variable and complex causes. Multivariable models including variables known to affect the outcome of interest are necessary. Although it is difficult to conceive confounding in associations related to genotype, multivariable analyses help in adjusting the observed effect, and may strengthen it, or reveal it to be weak.

There are various strategies to address the issue of multiple testing including the two-set approach and Bonferroni correction. In the difficulty of achieving appropriate sized case cohorts, Bonferroni correction may be too strict, while the two-set approach may lead to loss of power in very small case cohorts. Retrospective cohorts are difficult to reconstruct with complete data, and in particular lead to inadequate measure of the phenotype/outcome of interest, which may be falsely recorded as a case or unintentionally missed. Prospective cohorts require a minimum 95% participation to represent the population. Cross sectional case control selection requires that accurate data of variables known to affect the outcome be included. While genetic loci cannot be confounded in the traditional sense, these variables are necessary to adjust the measured effect size and place it in context. A case control design has the advantage of increasing the number of cases, and thus contributing greater power. While matching is a controversial topic, in transplant medicine matching allows accounting for a spectrum of variables without subsequent adjustment. Matching time-to-event in controls is one way to approximate similar experience of immune suppression and risk experience in controls.

A major concern is also to identify the most relevant phenotype to address in genetic association studies. New immunosuppressive regimens have considerably decreased acute rejection rates (at least in kidney transplantation), which make adequately powered studies difficult to undertake in restricted transplant populations. Alternately chronic dysfunction is an attractive phenotype to study since it addresses a particularly relevant long-term outcome. It is however very

difficult to define consensually and homogeneously. Variation in phenotype selection among studies is a limit for replication and the identification of valuable markers.

We agree with other authors that a collaborative approach, with studies based on large populations, with uniform definition of phenotypes is warranted to reach a sufficient level of evidence [41].

#### References

- [1] E. Thervet, M.A. Lorient, S. Barbier, M. Buchler, M. Flicheux, G. Choukroun, et al., Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing, *Clin. Pharmacol. Ther.* 87 (2010) 721–726, <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.2010.17>.
- [2] S.E. Marshall, K.I. Welsh, The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation, *Genes Immun.* 2 (2001) 297–303, <http://dx.doi.org/10.1038/sjgene.6363795>.
- [3] B. Krüger, B. Schröppel, B.T. Murphy, Genetic polymorphisms and the fate of the transplanted organ, *Transplant. Rev. Orlando Fla.* 22 (2008) 131–140, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tre.2007.12.002>.
- [4] D.M. Gritta, G. Burckart, A. Zeevi, Effect of cytokine and pharmacogenomic genetic polymorphisms in transplantation, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 614–625, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2008.08.002>.
- [5] A.S. Goldfarb-Rumyantsev, N. Naiman, Genetic prediction of renal transplant outcome, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 17 (2008) 573–579, <http://dx.doi.org/10.1097/MNH.0b013e32830f4579>.
- [6] J. Martin, J. Worthington, S. Harris, S. Martin, The influence of class II transactivator and interleukin-6 polymorphisms on the production of antibodies to donor human leucocyte antigen mismatches in renal allograft recipients, *Int. J. Immunogenet.* 36 (2009) 235–239, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2009.00854.x>.
- [7] N. Poirier, G. Blanchon, B. Vanhove, A more selective costimulatory blockade of the CD28–B7 pathway, *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 24 (2011) 2–11, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.2010.01176.x>.
- [8] A. Pawlik, E. Dabrowska-Zamojcin, V. Dziedzic, K. Safranow, L. Domanski, Association between IVS3 + 17 T/C CD28 gene polymorphism and the acute kidney allograft rejection, *Transpl. Immunol.* 30 (2014) 84–87, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2013.12.002>.
- [9] S. Dmitrienko, D.J. Hoar, R. Balshaw, P.A. Keown, Immune response gene polymorphisms in renal transplant recipients, *Transplantation* 80 (2005) 1773–1782.
- [10] K. Kloda, L. Domanski, K. Bobrek-Lesiakowska, A. Pawlik, K. Safranow, E. Kwiatkowska, et al., The impact of CTLA4 and PTPN22 genes polymorphisms on long-term renal allograft function and transplant outcomes, *Ren. Fail.* 35 (2013) 1223–1227, <http://dx.doi.org/10.3109/0886022X.2013.823871>.
- [11] S. Dmitrienko, *Gene Polymorphisms in Renal Transplantation*, Kiev Medical University, 2004.
- [12] M.H. Karimi, S. Hejr, B. Geramizadeh, R. Yaghobi, M.M. Sagheb, E. Kamali-Sarvestani, Combined analysis of cytokine gene polymorphism and the level of expression with allograft function in kidney transplant recipients, *Transpl. Immunol.* 30 (2014) 46–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.09.006>.
- [13] H. Park, S. Shin, M.H. Park, Y.S. Kim, C. Ahn, J. Ha, et al., Association of IL-17 F gene polymorphisms with renal transplantation outcome, *Transplant. Proc.* 46 (2014) 121–123, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.05.015>.
- [14] S. Hejr, M.H. Karimi, R. Yaghobi, E. Kamali-Sarvestani, B. Geramizadeh, J. Roosteh, Association of IL-17, IL-21, and IL-23R gene polymorphisms with HBV infection in kidney transplant patients, *Viral Immunol.* 26 (2013) 201–206, <http://dx.doi.org/10.1089/vim.2013.0007>.
- [15] M.C. Warlé, A. Farhan, H.J. Metselaar, W.C. Hop, A.J. van der Plas, M. Kap, et al., In vitro cytokine production of TNF-alpha and IL-13 correlates with acute liver transplant rejection, *Hum. Immunol.* 62 (2001) 1258–1265.
- [16] C.F. Andrade, T.K. Waddell, S. Keshavjee, M. Liu, Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors, *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 5 (2005) 969–975, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00829.x>.
- [17] H. Krichen, Y. Gorgi, T. Dhaoui, Y. Mecheri, I. Sfar, R. Bardi, et al., Toll-like receptor 4 and CD14 gene polymorphisms in Tunisian kidney transplantation, *Transplant. Proc.* 45 (2013) 3472–3477, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.09.003>.
- [18] H. Ro, Y.-H. Hwang, H. Kim, J.C. Jeong, H. Lee, Y.-S. Doh, et al., Association of polymorphisms of interleukin-8, CXCR1, CXCR2, and selectin with allograft outcomes in kidney transplantation, *Transplantation* 91 (2011) 57–64.
- [19] H. Krichen, D. Khazen, I. Sfar, T. Ben Abdallah, R. Bardi, S. Jendoubi-Ayed, et al., Genetic polymorphisms of inflammatory molecules in Tunisian kidney transplantation, *Transplant. Proc.* 43 (2011) 433–436, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.01.029>.
- [20] U. Panzer, O.M. Steinmetz, R.A.K. Stahl, G. Wolf, Kidney diseases and chemokines, *Curr. Drug Targets* 7 (2006) 65–80.
- [21] J. Lacha, P. Hribova, K. Kotsch, I. Brabcova, K. Bartosova, H.-D. Volk, et al., Effect of cytokines and chemokines (TGF-beta, TNF-alpha, IL-6, IL-10, MCP-1, RANTES) gene polymorphisms in kidney recipients on posttransplantation outcome: influence of donor-recipient match, *Transplant. Proc.* 37 (2005) 764–766, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2004.12.224>.
- [22] B. Krüger, C.A. Böger, A. Obed, S. Farkas, U. Hoffmann, B. Banas, et al., RANTES/CCL5 polymorphisms as a risk factor for recurrent acute rejection, *Clin. Transpl.* 21 (2007) 385–390, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0012.2006.00654.x>.
- [23] B. Krüger, B. Schröppel, R. Ashkan, B. Marder, C. Zülke, B. Murphy, et al., A Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 2585–2589.



- [24] E.C. Pérez, N. Shulzhenko, A. Morgun, R.V.Z. Diniz, D.R. Almeida, C.C. Musatti, et al., Expression of Fas, FasL, and soluble Fas mRNA in endomyocardial biopsies of human cardiac allografts, *Hum. Immunol.* 67 (2006) 22–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2006.02.037>.
- [25] M. Akdis, S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, et al., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$  receptors, functions, and roles in diseases, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050> (701–21.e1–70).
- [26] G.K. Chin, C.L. Adams, B.S. Carey, S. Shaw, W.-Y. Tse, E.R. Kaminski, The value of serum neopterin, interferon-gamma levels and interleukin-12B polymorphisms in predicting acute renal allograft rejection, *Clin. Exp. Immunol.* 152 (2008) 239–244, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03632.x>.
- [27] J. Mytilineos, G. Laux, G. Opelz, Relevance of IL10, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ , and IL4R $\alpha$  gene polymorphisms in kidney transplantation: a collaborative transplant study report, *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4 (2004) 1684–1690, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00561.x>.
- [28] M.A. Jiménez-Sousa, A. Fernández-Rodríguez, M. Heredia, E. Tamayo, M. Guzmán-Fulgencio, C. Lajo, et al., Genetic polymorphisms located in TGF $\beta$ 1, AGTR1, and VEGFA genes are associated to chronic renal allograft dysfunction, *Cytokine* 58 (2012) 321–326, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.02.017>.
- [29] M. Shahbazi, A.A. Fryer, V. Pravica, I.J. Brogan, H.M. Ramsay, I.V. Hutchinson, et al., Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 260–264.
- [30] R.D. Mittal, P. Srivastava, V. Singh, P. Jaiswal, R. Kapoor, Association of common variants of vascular endothelial growth factor and interleukin-18 genes with allograft survival in renal transplant recipients of North India, *DNA Cell Biol.* 30 (2011) 309–315, <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2010.1138>.
- [31] F.B.C. Lemos, W.M. Mol, J.J. Roodnat, A. Uitterlinden, J.N.M. Ijzermans, W. Weimar, et al., The beneficial effects of recipient-derived vascular endothelial growth factor on graft survival after kidney transplantation, *Transplantation* 79 (2005) 1221–1225.
- [32] M. Fischereder, B. Luckow, B. Hoher, R.P. Wüthrich, U. Rothenpieler, H. Schneeberger, et al., CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival, *Lancet* 357 (2001) 1758–1761.
- [33] R. Singh, R. Kapoor, A. Srivastava, R.D. Mittal, Impact of chemokine receptor CCR2 and CCR5 gene polymorphism on allograft outcome in North Indian renal transplant recipients, *Scand. J. Immunol.* 69 (2009) 51–56, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2008.02192.x>.
- [34] R. Abdi, T.B.H. Tran, A. Sahagun-Ruiz, P.M. Murphy, B.M. Brenner, E.L. Milford, et al., Chemokine receptor polymorphism and risk of acute rejection in human renal transplantation, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 754–758.
- [35] R. Cha, S.H. Yang, H.S. Kim, S.M. Kim, M.H. Park, J. Ha, et al., Genetic interactions between the donor and the recipient for susceptibility to acute rejection in kidney transplantation: polymorphisms of CCR5, *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* 24 (2009) 2919–2925, <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfp317>.
- [36] S. Firasat, A. Raza, A. Abid, T. Aziz, M. Mubarak, S.A.A. Naqvi, et al., The effect of chemokine receptor gene polymorphisms (CCR2V64I, CCR5-59029G>A and CCR5Δ32) on renal allograft survival in Pakistani transplant patients, *Gene* 511 (2012) 314–319, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.099>.
- [37] B. Yigit, N. Bozkurt, I. Berber, I. Titiz, T. Isbir, Analysis of CC chemokine receptor 5 and 2 polymorphisms and renal transplant survival, *Cell Biochem. Funct.* 25 (2007) 423–426, <http://dx.doi.org/10.1002/cbf.1322>.
- [38] W.S. Oetting, Y. Zhu, M.J. Brott, A.J. Matas, G.K. Corder, W. Pan, Validation of genetic variants associated with early acute rejection in kidney allograft transplantation, *Clin. Transpl.* 26 (2012) 418–423, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0012.2011.01522.x>.
- [39] R. Günesacar, G. Opelz, E. Erken, S. Pelzl, B. Döhler, A. Ruhenstroth, et al., VEGF 936 C/T gene polymorphism in renal transplant recipients: association of the T allele with good graft outcome, *Hum. Immunol.* 68 (2007) 599–602, <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2007.03.015>.
- [40] S.E. Marshall, A.J. McLaren, N.A. Haldar, M. Bunce, P.J. Morris, K.I. Welsh, The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation, *Transplantation* 70 (2000) 1485–1491.
- [41] S.E. Marshall, A.J. McLaren, E.F. McKinney, T.G. Bird, N.A. Haldar, M. Bunce, et al., Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation, *Transplantation* 71 (2001) 469–476.
- [42] S. Hoffmann, J. Park, L.M. Jacobson, R.J. Muehrer, D. Lorentzen, D. Kleiner, et al., Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy, *Kidney Int.* 66 (2004) 1686–1693, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00936.x>.
- [43] N.S. Alakulppi, L.E. Kyllönen, J. Partanen, K.T. Salmela, J.T. Laine, Lack of association between thrombosis-associated and cytokine candidate gene polymorphisms and acute rejection or vascular complications after kidney transplantation, *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. Eur. Ren. Assoc.* 23 (2008) 364–368, <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfm528>.
- [44] N.S. Alakulppi, L.E. Kyllönen, V.T. Jäntti, I.H. Matinlahti, J. Partanen, K.T. Salmela, et al., Cytokine gene polymorphisms and risks of acute rejection and delayed graft function after kidney transplantation, *Transplantation* 78 (2004) 1422–1428.
- [45] M. Loucaidou, J. Stichtbury, J. Lee, R. Borrows, S.E. Marshall, A.G. McLean, et al., Cytokine polymorphisms do not influence acute rejection in renal transplantation under tacrolimus-based immunosuppression, *Transplant. Proc.* 37 (2005) 1760–1761, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.03.151>.
- [46] P.K. Manchanda, R.D. Mittal, Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation, *Mol. Cell. Biochem.* 311 (2008) 57–65, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-007-9694-0>.
- [47] M. Müller-Stenhardt, C. Härtel, B. Müller, H. Kirchner, L. Fricke, The interleukin-6 – 174 promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival, *Kidney Int.* 62 (2002) 1824–1827, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00609.x>.
- [48] A.J.P. Smith, S.E. Humphries, Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality, *Cytokine Growth Factor Rev.* 20 (2009) 43–59, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.11.006>.
- [49] H. Lee, B. Clark, H.C. Gooi, J. Stoves, C.G. Newstead, Influence of recipient and donor IL-1 $\alpha$ , IL-4, and TNF $\alpha$  genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection, *J. Clin. Pathol.* 57 (2004) 101–103.
- [50] A.K. Israni, N. Li, B.B. Cizman, J. Snyder, J. Abrams, M. Joffe, et al., Association of donor inflammation- and apoptosis-related genotypes and delayed allograft function after kidney transplantation, *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* 52 (2008) 331–339, <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2008.05.006>.
- [51] K.M. Brown, E. Kondeatis, R.W. Vaughan, S.P. Kon, C.K.T. Farmer, J.D. Taylor, et al., Influence of donor C3 allotype on late renal-transplantation outcome, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 2014–2023, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa052825>.
- [52] B. Breulmann, C. Bantis, M. Siekierka, C. Blume, S. Aker, N. Kuhr, et al., Influence of cytokine genes polymorphisms on long-term outcome in renal transplantation, *Clin. Transpl.* 21 (2007) 615–621, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0012.2007.00697.x>.
- [53] I. Brabcova, J. Petrasko, P. Hribova, K. Hyklova, K. Bartosova, J. Lacha, et al., Genetic variability of major inflammatory mediators has no impact on the outcome of kidney transplantation, *Transplantation* 84 (2007) 1037–1044, <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000285295.39275.3b>.
- [54] P. Sánchez-Velasco, E. Rodrigo, G. Fernández-Fresnedo, J.G. Ocejón-Vinyals, J.C. Ruiz, A. Arnau, et al., Influence of interleukin-6 promoter polymorphism – 174 g/c on kidney graft outcome, *Transplant. Proc.* 42 (2010) 2854–2855, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.07.041>.
- [55] A. Thakkinian, S. Dmitrienko, M. Gerbase-DeLima, D.O. McDaniel, P. Inigo, K.M. Chow, et al., Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data, *Nephrol. Dial. Transplant.* 23 (2008) 3017–3023, <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn185>.
- [56] W. Wu, Y. Liu, S. Li, L. Hu, X. Sun, L. Cai, et al., Association between IL-4 polymorphism and acute rejection of solid organ allograft: a meta-analysis, *Gene* 513 (2013) 14–21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.028>.
- [57] Y.-Z. Ge, R. Wu, T.-Z. Lu, R.-P. Jia, M.-H. Li, X.-F. Gao, et al., Combined effects of TGF $\beta$ 1 + 869 T/C and + 915 G/C polymorphisms on acute rejection risk in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis, *PLoS ONE* 9 (2014) e93938, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0093938>.
- [58] R. Pelletier, V. Pravica, C. Perrey, D. Xia, R.M. Ferguson, I. Hutchinson, et al., Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation, *Transplantation* 70 (2000) 674–680.
- [59] J.-Y. Park, M.H. Park, H. Park, J. Ha, S.J. Kim, C. Ahn, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms and renal allograft rejection in Koreans, *Tissue Antigens* 64 (2004) 660–666, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00330.x>.
- [60] A. Pawlik, L. Domanski, J. Rozanski, M. Florczak, J. Wrzesniewska, G. Dutkiewicz, et al., The cytokine gene polymorphisms in patients with chronic kidney graft rejection, *Transpl. Immunol.* 14 (2005) 49–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2004.12.004>.
- [61] E.M. El-Gazawy, E.N. Eldin, W.S. Mohamed, M.S. Mahmoud, S.A. Saied, H.H. Abd El-Latif, et al., Tumor necrosis factor- $\alpha$  and monocyte chemoattractant protein-1 gene polymorphisms in kidney transplant recipients, *Saudi J. Kidney Dis. Transpl. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transpl. Saudi Arab* 24 (2013) 688–695.
- [62] J. Grinyó, Y. Vanrenterghem, B. Nashan, F. Vincenti, H. Ekberg, K. Lindpaintner, et al., Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation, *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 21 (2008) 879–891, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.2008.00679.x>.
- [63] F. Mendoza-Carrera, S. Ojeda-Durán, E. Angulo, F. Rivas, G. Macías-López, E.P. Buen, et al., Influence of cytokine and intercellular adhesion molecule-1 gene polymorphisms on acute rejection in pediatric renal transplantation, *Pediatr. Transplant.* 12 (2008) 755–761, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3046.2008.00893.x>.
- [64] A. Pawlik, L. Domanski, J. Rozanski, B. Czerny, Z. Juzysyn, G. Dutkiewicz, et al., The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival, *Ann. Transplant. Q. Pol. Transplant. Soc.* 13 (2008) 54–58.
- [65] N. Gandhi, D. Goldman, D. Kahan, S. Supran, R. Saloman, F. Delmonico, et al., Donor cytokine gene polymorphisms are associated with increased graft loss and dysfunction after transplant, *Transplant. Proc.* 33 (2001) 827–828.
- [66] D. Sankaran, A. Asderakis, S. Ashraf, I.S. Roberts, C.D. Short, P.A. Dyer, et al., Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation, *Kidney Int.* 56 (1999) 281–288, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00536.x>.
- [67] L.G. Wrammer, J. Norrby, M. Hahn-Zoric, J. Ahlén, P.-A. Björjesson, J. Carlström, et al., Impaired kidney graft survival is associated with the TNF- $\alpha$  genotype, *Transplantation* 78 (2004) 117–121.
- [68] T. Dhauadi, I. Sfar, R. Bardi, S. Jendoubi-Ayed, T.B. Abdallah, K. Ayed, et al., Cytokine gene polymorphisms in kidney transplantation, *Transplant. Proc.* 45 (2013) 2152–2157, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.12.006>.
- [69] F. Poli, L. Boschiero, F. Giannoni, M. Tonini, M. Scalomogna, G. Ancona, et al., Tumour necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism: implications in kidney transplantation, *Cytokine* 12 (2000) 1778–1783, <http://dx.doi.org/10.1006/cyto.2000.0779>.



- [70] K. Gendzekhadze, P. Rivas-Vetencourt, R.F. Montano, Risk of adverse post-transplant events after kidney allograft transplantation as predicted by CTLA-4 + 49 and TNF-alpha -308 single nucleotide polymorphisms: a preliminary study, *Transpl. Immunol.* 16 (2006) 194–199, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2006.09.001>.
- [71] P.N. Nikolova, M.I. Ivanova, S.M. Mihailova, A.P. Myhailova, D.N. Baltadjieva, P.L. Simeonov, et al., Cytokine gene polymorphism in kidney transplantation – impact of TGF-beta 1, TNF-alpha and IL-6 on graft outcome, *Transpl. Immunol.* 18 (2008) 344–348, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2007.10.003>.
- [72] K. Tinkam, D. Rush, I. Hutchinson, I. Dembinski, V. Pravica, J. Jeffery, et al., The relative importance of cytokine gene polymorphisms in the development of early and late acute rejection and six-month renal allograft pathology, *Transplantation* 79 (2005) 836–841.
- [73] A. Mandegary, J. Azmandian, S. Soleymani, M. Pootari, S.-D. Habibzadeh, M.-R. Ebadzadeh, et al., Effect of donor tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genotypes on delayed graft function and acute rejection in kidney transplantation, *Iran. J. Kidney Dis.* 7 (2013) 135–141.
- [74] A. Hutchings, L. Guay-Woodford, J.M. Thomas, C.J. Young, W.M. Purcell, V. Pravica, et al., Association of cytokine single nucleotide polymorphisms with B7 costimulatory molecules in kidney allograft recipients, *Pediatr. Transplant.* 6 (2002) 69–77.
- [75] M. Ubaldi de Capei, E. Dametto, M.E. Fasano, M. Messina, L. Pratico, S. Rendine, et al., Cytokines and chronic rejection: a study in kidney transplant long-term survivors, *Transplantation* 77 (2004) 548–552.
- [76] N. Azarpira, M.H. Aghdaie, B. Geramizadeh, S. Behzadi, S. Nikeghbalian, F. Sagheb, et al., Cytokine gene polymorphisms in renal transplant recipients, *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* 4 (2006) 528–531.
- [77] N. Tajik, T. Kazemi, A. Delbandi, A. Ghods, A. Salek Moghaddam, The predictive value of HLA-DR matching and cytokine gene polymorphisms in renal allograft acute rejection: a Living-Unrelated Donor (LURD) Study, *Iran. J. Immunol.* 3 (2006) 150–156 ([doi:10.1016/j.ijim.2006.01.004](http://dx.doi.org/10.1016/j.ijim.2006.01.004)).
- [78] S. Satoh, M. Saito, K. Inoue, M. Miura, A. Komatsuda, T. Habuchi, Association of cytokine polymorphisms with subclinical progressive chronic allograft nephropathy in Japanese renal transplant recipients: preliminary study, *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* 14 (2007) 990–994, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-2042.2007.01886.x>.
- [79] N. Azarpira, M. Ramzi, M.H. Aghdaie, M. Darai, B. Geramizadeh, Interleukin-10 gene polymorphism in bone marrow transplant recipients, *Exp. Clin. Transplant. Off. J. Middle East Soc. Organ Transplant.* 6 (2008) 74–79.
- [80] F. Khan, A. Sar, I. Gonul, H. Benediktsson, J. Doulla, S. Yilmaz, et al., Graft inflammation and histologic indicators of kidney chronic allograft failure: low-expressing interleukin-10 genotypes cannot be ignored, *Transplantation* 90 (2010) 630–638, <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e3181ea391e>.
- [81] W.S. Oetting, D.P. Schladt, R.E. Leduc, P.A. Jacobson, W. Guan, A.J. Matas, et al., Validation of single nucleotide polymorphisms associated with acute rejection in kidney transplant recipients using a large multi-center cohort, *Transpl. Int. Off. J. Eur. Soc. Organ Transplant.* 24 (2011) 1231–1238, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.2011.01359.x>.
- [82] M. Kociarz, U. Siekiera, A. Kolonko, H. Karkoszka, J. Chudek, L. Cierpka, et al., 174C/C interleukin-6 gene polymorphism and the risk of transplanted kidney failure or graft loss during a 5-year follow-up period, *Tissue Antigens* 77 (2011) 283–290, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01623.x>.
- [83] A. Gaafar, A. Iqniebi, A. Sheereen, A. Eldali, H. Turpeinen, C. Adra, et al., Study of the cytokine polymorphisms in correlation to rejection and graft survival in renal allograft donors and recipients from a homogenous Saudi population, *Transpl. Immunol.* 30 (2014) 34–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2013.11.006>.
- [84] D.O. McDaniel, W.H. Barber, C. Nguyen, S.W. Rhodes, W.L. May, L.S. McDaniel, et al., Combined analysis of cytokine genotype polymorphism and the level of expression with allograft function in African-American renal transplant patients, *Transpl. Immunol.* 11 (2003) 107–119, [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-3274\(02\)00171-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-3274(02)00171-5).
- [85] A.L. Lobashevsky, J.E. Manwaring, M.M. Travis, B.L. Nord, N.G. Higgins, Y.A. Serov, et al., Effect of desensitization in solid organ transplant recipients depends on some cytokines genes polymorphism, *Transpl. Immunol.* 21 (2009) 169–178, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2009.03.002>.
- [86] M.D. Omrani, M.R. Mokhtari, M. Bagheri, P. Ahmadpoor, Association of interleukin-10, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival, *Iran. J. Kidney Dis.* 4 (2010) 141–146.
- [87] J.C.O. Crispim, I.J. Wastowski, D.M. Rassi, C.T. Mendes-Junior Silva, C. Bassi, E.C. Castelli, et al., Interferon-gamma + 874 polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene and kidney allograft outcome, *Transplant. Proc.* 42 (2010) 4505–4508, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.10.014>.
- [88] L. Zibar, J. Wagner, D. Pavlinić, J. Galić, J. Pasini, K. Juras, et al., The relationship between interferon-gamma gene polymorphism and acute kidney allograft rejection, *Scand. J. Immunol.* 73 (2011) 319–324, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02506.x>.
- [89] M.H. Karimi, S. Daneshmandi, A.A. Pourfathollah, B. Geramizadeh, R. Yaghobi, G.A. Rais-Jalali, et al., A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients, *Mol. Biol. Rep.* 39 (2012) 509–515, <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-011-0765-7>.
- [90] N.H. Cartwright, L.J. Keen, A.G. Demaine, N.J. Hurlock, R.J. McGonigle, P.A. Rowe, et al., A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation, *Transpl. Immunol.* 8 (2001) 237–244.
- [91] A.B. Hahn, J.C. Kasten-Jolly, D.M. Constantino, E. Graffunder, D.J. Conti, Promoter-region alleles of the TNF-alpha and IL-10 genes have no effect on pretransplant alloantibody production, *Transplantation* 72 (2001) 739–742.
- [92] A. Melk, T. Henne, T. Kollmar, J. Strehlau, K. Latta, G. Offner, et al., Cytokine single nucleotide polymorphisms and intrarenal gene expression in chronic allograft nephropathy in children, *Kidney Int.* 64 (2003) 314–320, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00050.x>.
- [93] M. Amirzargar, M. Yavangi, A. Basiri, S.H. Moghadam, F. Khosravi, G. Solgi, et al., Genetic association of interleukin-4, interleukin-10, and transforming growth factor-beta gene polymorphism with allograft function in renal transplant patients, *Transplant. Proc.* 39 (2007) 954–957, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.03.054>.
- [94] Y. Seyhun, J. Mytilineos, A. Turkmen, F. Oguz, C. Kekik, K. Ozdilli, et al., Influence of cytokine gene polymorphisms on graft rejection in Turkish patients with renal transplants from living related donors, *Transplant. Proc.* 44 (2012) 1670–1678, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2012.05.046>.
- [95] Z. Chen, R. Bouamar, R.H.N. Van Schaik, J.W. De Fijter, A. Hartmann, M. Zeier, et al., Genetic polymorphisms in IL-2, IL-10, TGF-beta1, and IL-2RB and acute rejection in renal transplant patients, *Clin. Transpl.* 28 (2014) 649–655, <http://dx.doi.org/10.1111/ctr.12346>.
- [96] S. George, D. Turner, M. Reynard, C. Navarrete, I. Rizvi, O.N. Fernando, et al., Significance of cytokine gene polymorphism in renal transplantation, *Transplant. Proc.* 33 (2001) 483–484.
- [97] A. Asderakis, D. Sankaran, P. Dyer, R.W. Johnson, V. Pravica, P.J. Sinnott, et al., Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation, *Transplantation* 71 (2001) 674–677.
- [98] K.L. Poole, P.J. Gibbs, P.R. Evans, S.A. Sadek, W.M. Howell, Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study, *Transpl. Immunol.* 8 (2001) 259–265.
- [99] P.K. Manchanda, H.K. Bid, A. Kumar, R.D. Mittal, Genetic association of interleukin-1 beta and receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism with allograft function in renal transplant patients, *Transpl. Immunol.* 15 (2006) 289–296, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2006.01.004>.
- [100] M. Krajewska, K. Kościelna-Kasprzak, W. Weyde, D. Drulis-Fajdasz, K. Madziarska, O. Mazanowska, et al., Recipient genetic determinants of inflammatory process and nonstandard atherosclerosis risk factors affect kidney graft function early post-transplantation, *Transplant. Proc.* 41 (2009) 3060–3062, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.07.088>.
- [101] A. Pawlik, L. Domanski, J. Rozanski, M. Florczak, E. Dabrowska-Zamojcin, G. Dutkiewicz, et al., IL-2 and TNF-alpha promoter polymorphisms in patients with acute kidney graft rejection, *Transplant. Proc.* 37 (2005) 2041–2043, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.03.091>.
- [102] A. Morgun, N. Shulzhenko, G.F. Rampim, J.O.P. Medina, P.G.P. Machado, R.V.Z. Diniz, et al., Interleukin-2 gene polymorphism is associated with renal but not cardiac transplant outcome, *Transplant. Proc.* 35 (2003) 1344–1345.
- [103] D. Revirion, B. Dussol, M. Andre, P. Brunet, P. Mercier, Y. Berland, TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients, *Transplant. Proc.* 33 (2001) 350–351.
- [104] M. Müller-Steinhardt, L. Fricke, B. Müller, B. Ebel, H. Kirchner, C. Härtel, Cooperative influence of the interleukin-6 promoter polymorphisms – 597, – 572 and – 174 on long-term kidney allograft survival, *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 4 (2004) 402–406.
- [105] G. La Manna, M.L. Cappuccilli, I. Capelli, O. Baraldi, V. Cuna, G. Battaglini, et al., The impact of apoptosis and inflammation gene polymorphisms on transplanted kidney function, *Ann. Transplant. Q. Pol. Transplant. Soc.* 18 (2013) 256–264, <http://dx.doi.org/10.12659/AOT.883931>.
- [106] M. Hueso, E. Navarro, F. Moreso, V. Beltrán-Sastre, F. Ventura, J.M. Grinyó, et al., Relationship between subclinical rejection and genotype, renal messenger RNA, and plasma protein transforming growth factor-beta1 levels, *Transplantation* 81 (2006) 1463–1466, <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000206102.67063.24>.
- [107] J.-H. Cho, S. Huh, T.-G. Kwon, J.-Y. Choi, I.-K. Hur, E.-Y. Lee, et al., Association of C-509T and T869C polymorphisms of transforming growth factor-beta1 gene with chronic allograft nephropathy and graft survival in Korean renal transplant recipients, *Transplant. Proc.* 40 (2008) 2355–2360, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.06.047>.
- [108] P. Iñigo, S. Lario, J.M. Campistol, M. Bescós, B. Campos, F. Oppenheimer, Role of transforming growth factor beta-1 gene polymorphisms in the development of chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients, *Nefrol. Publ. Off. Soc. Esp. Nefrol.* 23 (2003) 312–320.
- [109] S. Ochsner, Z. Guo, U. Binswanger, A. Knoflach, TGF-beta 1 gene expression in stable renal transplant recipients: influence of TGF-beta 1 gene polymorphism and immunosuppression, *Transplant. Proc.* 34 (2002) 2901–2903.
- [110] K.M. Chow, C.C. Szeto, P. Poon, W.Y. Lau, F.M.-M. Lai, P.K.-T. Li, Transforming growth factor-beta1 gene polymorphism in renal transplant recipients, *Ren. Fail.* 27 (2005) 671–675.
- [111] C. Li, L. Yu, J. Xu, S. Fu, W. Deng, C. Du, et al., Association between transforming growth factor beta-1 gene polymorphism and chronic allograft nephropathy, *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27 (2007) 535–537.
- [112] S.J. Park, Y.C. Yoon, S.W. Kang, T.H. Kim, Y.W. Kim, H. Joo, et al., Impact of IL2 and IL2RB genetic polymorphisms in kidney transplantation, *Transplant. Proc.* 43 (2011) 2383–2387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.06.014>.
- [113] E. Kwiatkowska, L. Domanski, K. Kloda, A. Pawlik, K. Safranow, K. Ciechanowski, IL2-IL21 gene cluster polymorphism is not associated with allograft function after kidney transplantation, *Int. Urol. Nephrol.* 46 (2014) 2415–2420, <http://dx.doi.org/10.1007/s11255-014-0867-y>.
- [114] D.-Y. Lee, S.-B. Song, J.-Y. Moon, K.-H. Jeong, S.J. Park, H.-J. Kim, et al., Association between interleukin-3 gene polymorphism and acute rejection after kidney



- transplantation, *Transplant. Proc.* 42 (2010) 4501–4504, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.09.153>.
- [115] T. Kobayashi, I. Yokoyama, S. Hayashi, M. Negita, Y. Namii, T. Nagasaka, et al., Genetic polymorphism in the IL-10 promoter region in renal transplantation, *Transplant. Proc.* 31 (1999) 755–756.
- [116] T.W. Hoffmann, J.-M. Halimi, M. Büchler, F. Velge-Roussel, A. Al-Najjar, J.-F. Marliere, et al., Impact of a polymorphism in the IL-12p40 gene on the outcome of kidney transplantation, *Transplant. Proc.* 41 (2009) 654–656, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.12.002>.
- [117] L. Kolesar, P. Novota, E. Krasna, A. Slavcev, O. Vklidky, E. Honsova, et al., Polymorphism of interleukin-18 promoter influences the onset of kidney graft function after transplantation, *Tissue Antigens* 70 (2007) 363–368, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00913.x>.
- [118] C.-D. Kim, H.-M. Ryu, J.-Y. Choi, H.-J. Choi, J.-H. Cho, et al., Association of G-137C IL-18 promoter polymorphism with acute allograft rejection in renal transplant recipients, *Transplantation* 86 (2008) 1610–1614, <http://dx.doi.org/10.1097/TP.0b013e31818870c4>.
- [119] H. Asano, T. Kobayashi, K. Uchida, S. Hayashi, I. Yokoyama, H. Inoko, et al., Significance of tumor necrosis factor microsatellite polymorphism in renal transplantation, *Tissue Antigens* 50 (1997) 484–488.
- [120] Y.-H. Kim, T.H. Kim, S.W. Kang, H.J. Kim, S.J. Park, K.H. Jeong, et al., Association between a TGFBR2 gene polymorphism (rs2228048, Asn389Asn) and acute rejection in Korean kidney transplantation recipients, *Immunol. Investig.* 42 (2013) 285–295, <http://dx.doi.org/10.3109/08820139.2013.777073>.
- [121] S.W. Kang, S.J. Park, Y.W. Kim, Y.H. Kim, H.S. Sohn, Y.C. Yoon, et al., Association of MCP-1 and CCR2 polymorphisms with the risk of late acute rejection after renal transplantation in Korean patients, *Int. J. Immunogenet.* 35 (2008) 25–31, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-313X.2007.00725.x>.
- [122] J. Azmandian, A. Mandegary, A. Saber, M. Torshabi, A. Etminan, M.-R. Ebadzadeh, et al., Chemokine receptor 2-V64I and chemokine receptor 5-Delta32 polymorphisms and clinical risk factors of delayed graft function and acute rejection in kidney transplantation, *Iran. J. Kidney Dis.* 6 (2012) 56–62.
- [123] Y. Gorgi, I. Sfar, S. Jendoubi-Ayed, M. Makhoul, T.B. Rhomdhane, R. Bardi, et al., Allograft renal rejection and chemokine polymorphism, *Saudi J. Kidney Dis. Transpl. Off. Publ. Saudi Cent. Organ Transpl. Saudi Arab* 22 (2011) 18–23.
- [124] J.P. Lee, J.B. Bae, S.H. Yang, R.-H. Cha, E.Y. Seong, Y.J. Park, et al., Genetic predisposition of donors affects the allograft outcome in kidney transplantation; polymorphisms of stromal-derived factor-1 and CXCR4 receptor 4, *PLoS ONE* 6 (2011) e16710, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016710>.
- [125] H.-J. Kim, K.-H. Jeong, S.-H. Lee, J.-Y. Moon, T. Lee, S.W. Kang, et al., Polymorphisms of the CTLA4 gene and kidney transplant rejection in Korean patients, *Transpl. Immunol.* 24 (2010) 40–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trim.2010.10.001>.
- [126] L. Domański, K. Bobrek-Lesiakowska, K. Kloda, A. Pawlik, K. Safranow, M. Wisniewska, et al., The impact of rs231775 (+49AG) CTLA4 gene polymorphism on transplanted kidney function, *Ann. Transplant. Q. Pol. Transplant. Soc.* 17 (2012) 29–35.
- [127] H. Krichen, I. Sfar, H. Hadj Kacem, R. Bardi, S. Jendoubi-Ayed, M. Makhoul, et al., (AT) repeat in the 3' untranslated region of the CTLA-4 gene and susceptibility to acute allograft rejection in Tunisian renal transplantation, *Transplant. Proc.* 42 (2010) 4314–4317, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.09.117>.
- [128] K. Kloda, L. Domański, A. Pawlik, M. Wiśniewska, K. Safranow, K. Ciechanowski, The impact of ICAM1 and VCAM1 gene polymorphisms on chronic allograft nephropathy and transplanted kidney function, *Transplant. Proc.* 45 (2013) 2244–2247, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2013.03.043>.
- [129] E. Nogueira, K.S. Ozaki, G.D. Macusso, R.F. Quarim, N.O.S. Câmara, A. Pacheco-Silva, Incidence of donor and recipient toll-like receptor-4 polymorphisms in kidney transplantation, *Transplant. Proc.* 39 (2007) 412–414, <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2007.01.026>.
- [130] D. Ducloux, M. Deschamps, M. Yannarakis, C. Ferrand, J. Bamoulid, P. Saas, et al., Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation, *Kidney Int.* 67 (2005) 2454–2461, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00354.x>.
- [131] S.M. Palmer, L.H. Burch, S. Mir, S.R. Smith, P.C. Kuo, W.F. Herczyk, et al., Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation, *Clin. Transpl.* 20 (2006) 30–36, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0012.2005.00436.x>.
- [132] T.H. Kim, K.-H. Jeong, S.K. Kim, S.H. Lee, C.G. Ihm, T.W. Lee, et al., TLR9 gene polymorphism (rs187084, rs352140): association with acute rejection and estimated glomerular filtration rate in renal transplant recipients, *Int. J. Immunogenet.* 40 (2013) 502–508, <http://dx.doi.org/10.1111/iji.12069>.
- [133] O. Vklidky, J.A. Hubáček, J. Kvasnicka, I. Matl, L. Voska, J. Skibová, et al., Association of methylenetetrahydrofolate reductase T677 allele with early development of chronic allograft nephropathy, *Clin. Biochem.* 37 (2004) 919–924, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.05.022>.

### **3. Variabilité des gènes codants pour les protéines participant à la pharmacodynamie des immunosuppresseurs**

Contrairement aux gènes des molécules signalisatrices activant le SI, ceux correspondant aux protéines ou aux voies cellulaires cibles des immunosuppresseurs (enzymes responsables de la formation *de novo* des purines, voie mTOR et voie de la calcineurine) ont été assez peu explorés en transplantation. Du fait des rôles multiples de ces voies cellulaires, les travaux disponibles dans la littérature (hors transplantation) ont mis en évidence des associations avec divers phénotypes : diabète, autres maladies auto-immunes, cancers, pathologies cardio-vasculaires, neurologiques, etc.

Dans le cadre de cette thèse nous avons réalisé une étude approfondie de cette littérature. Une grille de « classement » des SNPs d'intérêt, basée sur leur fonctionnalité et sur les précédentes associations publiées, a été proposée. Ce classement a permis d'élire un certain nombre de variants candidats et d'établir un niveau de recommandation pour leur étude en transplantation d'organe solide. Ce travail a fait l'objet d'un article de revue de littérature, publié dans le journal *Pharmacogenomics* en février 2016.



## New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs

Interindividual variability in immunosuppressive drug responses might be partly explained by genetic variants in proteins involved in the immune response or associated with IS pharmacodynamics. On a general basis, the pharmacogenetics of drug target proteins is less known and understood than that of proteins involved in drug disposition pathways. The aim of this review is to facilitate research related to the pharmacodynamics of the main immunosuppressive drugs used in solid organ transplantation. We elaborated a quality of evidence grading system based on a literature review and identified 'highly recommended', 'recommended' or 'potential' candidates for further research. It is likely that a number of additional rare variants might further explain drug response phenotypes in transplantation, and particularly the most severe ones. The advent of next-generation sequencing will help to identify those variants.

**First draft submitted:** 11 September 2015; **Accepted for publication:** 13 November 2015; **Published online:** 22 January 2016

**Keywords:** calcineurin • gene polymorphism • inosine monophosphate dehydrogenase • mammalian target of Rapamycin • personalized medicine • pharmacology

Immunosuppressants have narrow therapeutic ranges and have been identified as good candidates for pharmacogenetic research. A long history of work supports the hypothesis that polymorphisms in genes involved in immunosuppressant drug disposition pathways (e.g., metabolic enzymes and membrane transporters) affect dose-concentration relationships. However, environmental factors including comorbidities or drug-drug interactions and interindividual variability in molecular signaling pathways influence the drug response. Recent work has explored the impact of genetic variation in proteins of the pharmacodynamic pathways targeted by these drugs; however, interrogation of these genes in the context of solid organ transplantation (SOT) is only emerging.

The primary aim of this review is to promote and facilitate research related to the pharmacodynamics of the main immuno-

suppressive drugs used in SOT: the calcineurin inhibitors (CNI), namely ciclosporin (CsA) and tacrolimus (TAC); mTOR inhibitors (mTORi), namely everolimus (EVE) and sirolimus (SIR) and mycophenolic acid (MPA).

The major genes involved in the pharmacodynamics of each class of drugs will be detailed. As shown in Table 1, numerous SNPs are currently reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) SNP database (dbSNP; accessed August 2015). Although this information is curated, and most of the time accurate, it is nevertheless challenging to identify variant candidates for research using this data. In this review, the reader will find important information on gene variability, based on the dbSNP, and most importantly, based on literature reports exploring functionality of the variants and associations observed in

Lucie Pouch<sup>\*,1,2</sup>, Jana Stojanova<sup>†,3</sup>, Pierre Marquet<sup>\*,1,2,4,5</sup> & Nicolas Picard<sup>1,2,4,5</sup>

<sup>1</sup>Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

<sup>2</sup>CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

<sup>3</sup>Laboratory of Chemical Carcinogenesis & Pharmacogenetics, University of Chile, Santiago, Chile

<sup>4</sup>Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France

<sup>5</sup>FHU SUPPORT, 87000 Limoges, France

\*Author for correspondence:

Tel.: +33 055 505 6017

Fax: +33 055 505 6162

[pierre.marquet@unilim.fr](mailto:pierre.marquet@unilim.fr)

<sup>†</sup>Authors contributed equally

Future  
Medicine  part of 



Table 1. List of the candidate genes and their characteristics addressed in the present review.

Gene symbol	Gene ID	Chromosome location	Exons (n)	Protein name	SNPs (n)	Insertion/deletion (n)	Missense variant (n)
<i>PPIA</i>	5478	7p15	6	Cyclophilin A	215	16	3
<i>FKBP1A</i>	2280	20p13	5	FKBP-12	599	26	2
<i>PPP3CA</i>	5330	4q24	14	Calcineurin A $\alpha$	8287	401	5
<i>PPP3CB</i>	5532	10q22	17	Calcineurin A $\beta$	1592	83	13
<i>PPP3R1</i>	5534	2p15	6	Calcineurin B $\alpha$	2005	138	0
<i>CALM1</i>	801	14q32	7	Calmodulin 1	306	18	0
<i>CALM2</i>	805	2p21	6	Calmodulin 2	505	34	4
<i>CALM3</i>	808	19q13.2–q13.3	6	Calmodulin 3	279	11	0
<i>NFATC1</i>	4772	18q23	11	NFAT2	5882	183	73
<i>NFATC2</i>	4773	20q13.2	13	NFAT1	5357	242	55
<i>NFATC3</i>	4775	16q22.2	12	NFAT4	3442	174	60
<i>IL2</i>	3558	4q26–q27	4	IL2	93	5	4
<i>MTOR</i>	2475	1p36	59	mTOR	1014	114	2
<i>RPTOR</i>	57521	17q25.3	34	Raptor	3333	289	9
<i>RPS6KB1</i>	6198	17q23.1	19	p70 S6 kinase	217	44	0
<i>MLST8</i>	64223	16p13.3	10	mLST8	20	0	0
<i>IMPDH1</i>	3614	7q31.3–q32	18	IMPDH1	90	7	0
<i>IMPDH2</i>	3615	3p21.2	15	IMPDH2	14	0	1

Data from GRCh38.p2 in variation viewer (accessed August 2015). Variants listed are those reported in the gene region only (no padding regions included), with a minor allelic frequency  $\geq 0.005$  in the 1000-genomes project.

different phenotypes. Subsequent sections will present associations tested in the context of SOT.

In order to facilitate further research, we elaborated a grading of quality of evidence (QOE) regarding the effect of genetic variants highlighted from the review, and classified the most interesting ones based on a level of recommendation (LOR) as ‘highly recommended’, ‘recommended’ or ‘potential’ candidates for further research in SOT using the criteria listed in Table 2.

### The pharmacogenetics of CNI pharmacodynamics

#### Genes related to CNI pharmacodynamics

CsA and TAC exert their immunosuppressive effects on lymphocytes by several mechanisms, the primary being inhibition of the calcineurin pathway (Figure 1), upregulated following T-cell activation. Antigen interaction with the T-cell receptor (TCR) triggers a signaling cascade that facilitates calmodulin-calcineurin binding, which in turn disinhibits an autoregulatory motif, permitting catalytic activity. Activated calcineurin de-phosphorylates NFAT, allowing it to translocate to the nucleus where it acts as transcription factor. NFAT performs in conjunction with the co-factor AP-1, a Fos-Jun complex: each element of the dimer is

activated in previous steps by different signaling cascades resulting from TCR activation (e.g., the RAS–MAPK or PKC pathways). The interaction between AP-1 and NFAT enhances the DNA binding affinity of each partner [1].

CsA and TAC bind distinct intracellular immunophilins to effectuate calcineurin inhibition, the former binding to cyclophilins and the latter to FKBP12. While CsA binds two similar but distinct cyclophilins, inhibitory action is attributed to cytoplasmic cyclophilin A [2]. FKBP12, containing a single FK506 (i.e., TAC) binding domain, is the only member of this immunophilin family to bind and act with TAC [3].

Calcineurin is a heterodimeric protein composed of a catalytic and a regulatory subunits. There are three distinct catalytic subunits (CnA $\alpha$ , CnA $\beta$  and CnA $\gamma$ ) and two regulatory subunits (CnB1 and CnB2). CnA $\gamma$  and CnB2 exhibit testes specific expression [4]. CnA $\beta$  shows a predominant cellular distribution in B and T lymphocytes in rats [5]. The opposite relative distribution is found in the kidney and tissues of the central nervous system where CnA $\alpha$  predominates [5,6]. Gene knock-out studies have confirmed that the CnA $\beta$  subunit has a crucial role in response to antigen [7]. While lymphocytes from CnA $\alpha$  deficient mice exhibit





essentially normal responses *in vitro*, *in vivo* exposure to antigen and subsequent restimulation assays demonstrate deficient responses [8]. Some authors interpret this to be potentially due to anergy [9].

Calmodulin is coded by three distinct, independent genes located on chromosome 14, 2 and 19 (*CALM1*, 2 and 3), the order of expression being *CALM3*>*CALM2*>*CALM1* [10,11]. Of five NFAT proteins, calcium signaling regulates four, and three are expressed in T cells: NFAT1, NFAT2 and NFAT4. Co-expression in T cells may balance the lack of individual members of the NFAT family [12], which lead us to think genetic variation impacting expression levels or affinity would ultimately be compensated. The end result of the signal transduction pathway is transcription of various proteins, including IL2, stimulating further T cell responses.

The IL2/IL2-R binding results in CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation following the TCR-activation and leads to the initiation of the immune response contributing to rejection in SOT. IL2-R may comprise three independent chains: IL2-R $\alpha$ , also referred to as CD25 (*IL2RA*); IL2-R $\beta$  (*IL2RB*) and IL2-R $\gamma$  (*IL2RG*). Different combinations of these proteins define three classes of receptors: low affinity receptors contain only IL2-R $\alpha$ , intermediate affinity receptors are composed of IL2-R $\beta$  and  $\gamma$  and high affinity receptors contain all three chains [1]. The genes encoding the IL2-R will not be addressed in the present review.

All the genes related to the CNI pharmacodynamics referred to in this review are listed in Table 1 and Figure 1.

### Genetic variability of CNI pharmacodynamic proteins and promising loci

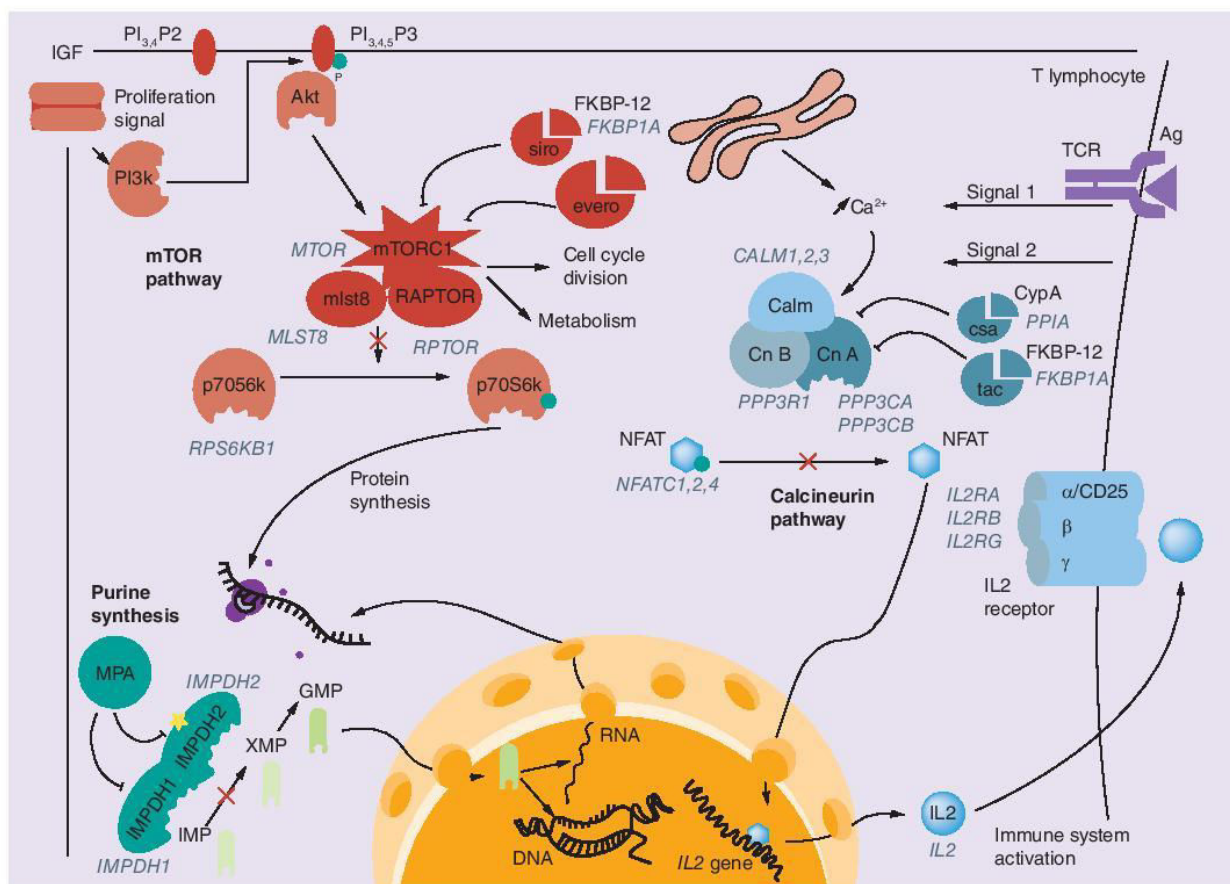
#### FKBP12 (*FKBP1A*)

All exons of *FKBP1A* were sequenced in a series of Japanese cases with myopathy (n = 79) with no variants found [13]. Our group sequenced the promoter and 5' untranslated region (5'UTR) (636 bp) and the start of exon 4 containing two missense variants reported without frequency and validation data in dbSNP: no variants were found (584 bp) (n = 46 healthy subjects) [14]. The gene was screened in a Brazilian admixed population of idiopathic dilated cardiomyopathy cases (n = 186). Three rare variants were found: two previously unreported promoter SNPs and rs6074549 in intron 2. The promoter SNPs did not associate with risk (n = 288 controls) [15].

*FKBP1A* was identified as part of a 20-gene signature for complicated sarcoidosis in both African-American and European-American (Caucasian) populations using genome-wide peripheral blood gene mRNA expression analysis. Using a genome wide association study (GWAS), the authors found that an intronic variant (rs1294689) in this gene associated with an increased risk of sarcoidosis in African-Americans (n = 407 cases; odds ratio [OR] = 1.536; p =  $4.8 \times 10^{-3}$ ) [16]. This

**Table 2. Criteria used for grading the quality of evidence of candidate genetic variants related to the pharmacodynamics pathways of immunosuppressive drugs, and the level of recommendation for further research in solid organ transplantation.**

Grade	Definition
<b>Quality of evidence</b>	
A	Evidence from one or more well-designed clinical study, and a clear mechanistic rationale supported by at least one <i>in vitro</i> or <i>ex vivo</i> functional study
B	Evidence from $\geq 2$ clinical studies with consistent data, and clear mechanistic rationale supported by <i>in silico</i> prediction (no <i>in vitro</i> functional study)
C	Evidence from $\geq 2$ clinical studies with consistent data but unclear or no mechanistic basis
D	Conflicting data and convincing data against a functional effect
<b>Level of recommendation for further research in solid organ transplantation</b>	
1	Highly recommended candidate: QOE of grade A or B, and $\geq 1$ positive association study in SOT or candidate not yet studied in SOT with a QOE of grade A
2	Recommended candidate: candidate not yet studied in SOT with a QOE of grade B
3	Potential candidate: QOE of C or candidate with a QOE of grade A or B unsuccessfully tested in one SOT ( $\leq 2$ negative studies)
4	Candidate to exclude: QOE of grade D or a QOE of grade A, B or C with convincing data against any statistical association in SOT ( $> 2$ negative studies)
Variants were not classified if no minor allele frequency was available in the dbSNP, or if evidence was strictly limited to a single <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> or clinical study. QOE: Quality of evidence; SOT: Solid organ transplantation.	



**Figure 1. Principle proteins involved in the pharmacodynamics of calcineurin inhibitors, mTOR inhibitors and mycophenolic acid in T cells. Corresponding genes appear in grey.**

Calm: Calmodulin; Cn A: Calcineurin A; Cn B: Calcineurin B; Csa: Cyclosporin; Cyp A: Cyclophilin A; evero: Everolimus; GMP: Guanosine monophosphate; IGF: Insulin growth factor; IMP: Inosine monophosphate; MPA: Mycophenolic acid; mlt8: Target of rapamycin complex subunit LST8; NFAT: Nuclear factor activated T cell; P: Phosphate; PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub>: Phosphatidylinositol-3,4 diphosphate; PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub>: Phosphatidylinositol-3,4,5 triphosphate; Siro: Sirolimus; TAC: Tacrolimus; XMP: Xanthine monophosphate.

finding requires confirmation before rs1294689 can be considered as a potential candidate.

#### Cyclophilin A (*PPIA*)

Sequencing *PPIA* promoter, coding and flanking regions has revealed most notably a promoter (rs8177826) and a 5'UTR (rs6850) SNPs [17–19]. A rare synonymous variant in exon 4 (rs177828) was found in a Spanish population, but was not tested in association analyses [19]. An *et al.* report eleven SNPs in *PPIA* after sequencing 92 African-Americans and 92 European-Americans, of which five in the promoter region. Notably, they sequenced far upstream from the transcription start site (rs4720485 and SNP2) were not included in subsequent analyses. The third, situated 408 bp upstream from *PPIA*-rs8177826, designated SNP3 C>G, was a novel report, and to date does not have an accession number in

dbSNP corresponding to the purported position. SNP3 and rs8177826 were in perfect linkage disequilibrium in both African-Americans and European-Americans.

*PPIA* is part of the HIV intracellular life cycle and associations with HIV susceptibility [17,20], disease progression defined as time to CD4 <200 [17,20,21], time to AIDS clinical diseases [17,20] or viral RNA load above 10<sup>4.5</sup> copies per milliliter [20] have either conflicted between studies, between subpopulations within studies (e.g., between Caucasians and Africans [17,20]) or were not significant depending on the phenotype. A GWAS in a large cohort of HIV-1 infected Caucasians was designed to have sufficient power to detect 1.3% of variation in viral load at set point, and added previously identified polymorphisms derived from a variety of previous candidate gene or SNP studies, thus including rs8177826 and rs6850 [22]. This group did not find an association with these SNPs under stringent significance



criteria. Furthermore, investigations in *ex vivo* models of viral replication did not determine a significant genotype effect for neither rs8177826 [20] nor rs6850 [20,21], further negating the impact of these variants in this particular context.

Since cyclophilin A is secreted by vascular smooth muscle cells in response to inflammatory stimuli, and could thus contribute to atherosclerosis, these two SNPs have been investigated in relation to myocardial infarction. No association was found with myocardial infarction in at-risk patients ( $n = 250$ ) as compared with controls ( $n = 250$ ), neither for rs8177826 C>G nor rs6850 A>G [19].

*In vitro* work suggests rs8177826 possibly has a functional consequence, while rs6850 does not appear to do so. SNP3 in the upstream promoter may be an interesting part of the story concerning the functionality observed with rs8177826 given perfect linkage disequilibrium in two ethnic populations [17]. In mobility shift assays SNP3 and rs8177826 influenced protein binding with nuclear extracts from stimulated Th1 human T lymphocytes, with minor alleles causing a fourfold decrease or 2.8-fold increase in band densities, respectively [17]. *In silico* analysis (using TESS software) predicted association with SP1, with loss of binding for the SNP3 G allele, and enhanced binding for the rs8177826 G allele. Luciferase reporter assays have demonstrated higher activity for constructs with the rs8177826 G allele [18,19]. However, Rits *et al.* found lower *PPIA* mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells amongst rs8177826-G carriers. Given the difference in the direction of the minor alleles of SNP3 and rs8177826 in binding analyses, and the difference in direction of the effect observed between luciferase reporter assays and measured cyclophilin-A mRNA levels, it is difficult to draw any conclusions about the *in vivo* functionality of this SNP as a biomarker (QOE = C for rs8177826). No effect was found for the rs6850 variant in either mobility shift or *in silico* analyses [17], or *PPIA* mRNA levels in PBMCs, conferring to this SNP a QOE of grade D [23].

#### Calcineurin isoforms (*PPP3CA*, *PPP3CB* & *PPP3R1*) Calcineurin A-alpha (*PPP3CA*) & calcineurin A-beta (*PPP3CB*)

Sequencing over the *PPP3CA* locus revealed a number of previously unreported short tandem repeat variations and a promoter SNP in a large cohort of European and African-Americans of illicit drug users, and nonuser controls. These include a GGC repeat in the 5'UTR region (8, 9 or 10 GGC; ss68756203, rs45441997); a 16-nucleotides tandem repeat in intron 1 (ss68756205) and a pentanucleotide repeat in intron 3 (ss68756204) [24]. The group was interested in this gene after rs1395475

emerged as one of 38 SNPs in a large GWAS meeting reproducibility criteria for a significant association with substance abuse [25,26]. The authors found significantly different genotype and allele frequencies of rs45441997 between drug abusers and controls but only amongst African-Americans: carriers of the nine GGC repeats were found more prevalent among drug abusers (after Bonferroni correction, allelic analyses) while homozygous carriers of the ten GGC repeats were more frequent among controls (not significant following Bonferroni correction, genotype analyses). *PPP3CA* mRNA expression (cDNA levels in  $n = 13$  medial temporal gyrus samples) in carriers of eight GGC repeats was significantly increased compared with carriers of ten GGC repeats ( $p = 0.0154$ ) [24]. The variant should thus be considered with a QOE of A.

Earlier investigation on *PPP3CA* using single-strand conformation polymorphism analysis revealed three rare SNPs (MAF 2–3% in a French population,  $n = 95$ ): one in the promoter (rs149278688) and two synonymous coding SNPs (rs3730251, rs78927351) [27]. This group did not find any association with cardiac hypertrophy and dilated cardiomyopathy in the cohort tested. Finally, the *PPP3CA* promoter rs2850328 was tested for association with aggressive breast cancer in a candidate gene study: no association was found among 182 breast cancer cases and 180 controls [28].

Sequencing work around the *PPP3CB* promoter, untranslated and flanking regions revealed two rare variants (no rs reported; French population,  $n = 95$ ): these did not associate with cardiac hypertrophy or dilated cardiomyopathy [27]. We sequenced 687 bp around the *PPP3CB* promoter in French healthy volunteers ( $n = 75$ ) and found no variants [14].

He *et al.* report a number of associations between variants in the five calcineurin subunit genes with a number of endurance phenotypes [29], cardiac responsiveness to training [30] and athletic status [31] in Han Chinese cohorts. A panel of 55 SNPs, all located within introns, untranslated or 3' regions of all calcineurine genes (*PPP3CA*, *PPP3CB*, *PPP3CC*, *PPP3R1* and *PPP3R2*), with a MAF>10% were selected from HapMap (Han Chinese). Limiting to outcomes involving *PPP3CA*, *PPP3CB* and *PPP3R1*, four SNPs were found to be significantly associated with at least one of the three phenotypes (*PPP3CA*: rs2850965 and rs3804358, *PPP3CB*: rs3763679, *PPP3R1*: rs4671887). *PPP3CA*-rs2850965 and *PPP3R1*-rs4671887 were not tested in functional experimental models, nor the associations validated [31]. Luciferase reporter assays were performed for *PPP3CA*-rs3804358 and *PPP3CB*-rs3763679, both in intron 3 of their respective genes: a genomic intron segment carrying the wild type or the mutant



allele was cloned upstream of the firefly luciferase expressing pGL3-promoter vector. For the former the minor allele conferred significantly greater luciferase activity, while for the latter significantly lower activity was found. These activities go in the same direction as the associations observed in Chinese athletes whereby a greater proportion of mixed-sex elite athletes were carriers of the *PPP3CA*-rs3804358C allele and a lower proportion were carriers of the *PPP3CB*-rs3763679 T compared with controls. Only *PPP3CB*-rs3763679 is polymorphic in Caucasians. Although the observed findings were not replicated in a male Spanish–Caucasian elite athlete and control cohort, both SNPs have a QOE of A [31].

#### Calcineurin B-alpha (*PPP3R1*)

Sequencing of the *PPP3R1* proximal promoter (787 bp amplicon) on  $n = 75$  Caucasian healthy volunteers revealed two major variants (rs4347819 and rs4519508) and a 29 bp insertion (rs72174030) with an important MAF not described in dbSNP database [14]. Tang *et al.* sequenced the 5' flanking region of *PPP3R1* and reported a novel insertion (-TTAAA-)/deletion [32]. An association was found between the deletion and inappropriately high left ventricular mass (but not left ventricular hypertrophy) in African–Americans only. *In silico* analyses of the alternative sequences (TRANSFAC transcription factor database and MatInspector program) predicted that the deletion eliminated a consensus Nkx-2 transcription factor binding site. Others have reported significant or near significant associations with endurance athlete phenotypes [33]. This variant appears to correspond to *PPP3R1*-rs3039851 -TTAAT-/deletion, which is located in intron 1. It is located at -1051 bp relative to the exon 2 (NM\_000945 sequence) (QOE = B).

In a candidate-gene endophenotype approach, Cruchaga *et al.* found a strong association between rs1868402 in intron 5 and phosphorylation of tau protein (CSF ptau181), a biomarker for Alzheimer's disease [34]. The genes of proteins known to be involved in tau phosphorylation were considered as candidates, including *PPP3CA* and *PPP3R1*. A tag SNP approach was used based on Caucasian HapMap data, with 384 SNPs across 34 genes (355 passing quality control). This SNP was the only one to pass replication in subsequent population datasets. It associated with Alzheimer disease progression, but not risk or age of onset: bibliographic data was discussed to provide mechanistic support for this outcome. Gene expression studies (mRNA extracts from the parietal lobe of Alzheimer cases) confirmed lower expression of *PPP3R1* in carriers of the minor allele (QOE = A) [34].

#### Calmodulin 1, 2 & 3 (*CALM1*, 2 & 3)

Among 13 missense variants for *CALM1* reported in dbSNP, only two have frequency data reported (MAF = 0.0001). Five have associated with cardiac arrests. Two variants, rs267607276 and rs267607277, were found following a genome-wide linkage analysis in a large Swedish family with a severe form of arrhythmia and in an individual of Iraqi origin. These variants cause Responsible of Asn to Ile substitution at position 53, and Asn to Ser substitution at position 97, respectively, and both demonstrate compromised calcium binding; rs267607277 also displays an aberrant interaction with the cardiac sarcoplasmic calcium channel (RYR2) [35]. Additional three missense SNPs (rs730882253 and rs730882252 (D130G) in *CALM1*, D96V in *CALM2* (no rs numbers designated to the latter) were determined by whole exome sequencing: both in two family members successfully resuscitated from cardiac arrest [36], and in a cohort of 82 subjects with congenital long-QT syndrome [11]. Mutations altered residues involved in calcium or target peptide binding [11,36]. The rs730882253 was found in two asymptomatic individuals displaying a marginally prolonged QT interval during exercise were found to be carriers of rs730882253 [36]. No MAF is reported for these polymorphisms in dbSNP, consistent with their rarity.

As calmodulin has an important role in osteoclastic activity, chondrocyte differentiation and functional bone resorption, several variants in intronic part and flanking regions of the calmodulin genes have been associated with bone diseases. The *CALM1* 5' UTR variant, rs12885713, has been the subject of several investigations for its role in bone disease including idiopathic scoliosis and osteoarthritis, however results have been conflicting. The minor allele differs among ethnic groups, and may explain the discrepant results: C is the minor allele in Caucasians (C = 0.4) whereas it is the predominant allele in Chinese/Japanese populations (CHB/JPT, C = 0.858). All significant clinical associations are found in studies performed on Chinese and Japanese population [37–39]. Two studies in large Caucasian cohorts ( $n = 920$  and  $n = 603$  osteoarthritis cases) did not find significant associations [40,41].

Sequencing of the promoter and flanking regions of *CALM1* performed on 16 hip osteoarthritis Japanese individuals revealed 21 SNPs, divided in eight haplotype groups (group A to H). A tag-SNP approach in a case-control study ( $n = 334$  cases and 375 controls, Japanese) found a significant association between one haplotype and hip osteoarthritis prevalence (0.331 in cases vs 0.268 in controls,  $p = 0.01$ ). This haplotype is composed of rs12885713, rs2300496, rs2300500, rs3213718 and rs3179089. All of these variants were individually associated with an increased risk of hip





osteoarthritis (ORs from 2.40, 95% CI [1.43–4.02] to 2.76, 95% CI [1.59–4.78]). The investigators tested the functional activity of rs12885713, located in the core promoter region of *CALM1* (217 nucleotides upstream the ATG), using luciferase assays in two types of cells (human chondrosarcoma derived and hepatoma cells): the construct containing the variant T allele showed approximately twofold lower luciferase activity than the C allele in both lines. Moreover, a gel shift assay with nuclear extract from hepatoma cells indicated that one or more nuclear factors (possibly suppressors of *CALM1* transcription) bound the T allele more tightly than the C allele. These results suggest a reduced transcriptional activity of the T allele compared with the C [37]. *CALM1*-rs12885713 receives an 'A' grading for QOE.

In subsequent work, the same group explored *CALM2* variability by sequencing a 16kb genomic region containing *CALM2* in 48 Japanese cases of hip osteoarthritis. Among the 18 SNPs detected, seven were novel reports discovered by the authors: one in the 5'UTR and six in intronic regions. Concerning the 11 known variants, one was located in the 5'UTR (rs1353644) and ten in intronic regions (rs878665, rs10153674, rs1723484, rs815815, rs815816, rs17036325, rs1027478, rs2454084, rs34473440 and rs3729958). None of these polymorphisms associated with hip osteoarthritis (n = 357 cases and 375 controls) in any of the four genetic model tested (allelic and genotype frequencies in both recessive and dominant models) [42]. The intronic rs815815 associated with increased risk in a GWAS performed in individuals with Type 2 diabetes (hazard ratio [HR] = 1.51; p = 6.5.10<sup>-7</sup>) [43].

The *CALM3* promoter was sequenced in a French population of 134 healthy individuals detecting a T>A polymorphism at position -34 (MAF, A = 0.30), likely to be rs150954567 [44]. The functional effect of this SNP is however doubtful: the frequency of T allele was significantly higher in hypertrophic cardiomyopathy affected patients when compared with controls (effect size not reported), but only a trend was observed when affected family members and healthy individuals were compared specifically (OR = 0.56 [0.31–1.01]; p = 0.053). Validation was not performed. Experimental work suggests that this SNP influences promoter activity: in luciferase assays, the *CALM3*-rs150954567-T promoter activity was 43% (p = 0.00001) and 72% (p = 0.00727) of that of the *CALM3*-A activity of the wild-type form in neonatal rat cardiomyocytes and human embryonic kidney cell lines, respectively (QOE = A) [44].

The intronic rs3213718 (C>T) was associated with severe forms of lumbar disc degeneration (OR T vs C = 1.26; p = 0.043) and with idiopathic scoliosis

(OR T vs C = 1.61 [1.06–2.46]; p = 0.026) in Indian (n = 695) and Chinese (n = 146) populations, respectively.

Rs3814843 T>G in the 3' UTR has been studied in cardiovascular diseases and a significant effect was found in the same direction for different phenotypes. The G variant significantly increases the risk of ischemic stroke (n = 5244) and severe coronary artery disease in Caucasian populations (with validation in an independent population for artery disease, n1 = 781 and n2 = 471) [45,46]. The same variant is associated with increased risk of sudden cardiac death in chronic heart failure patients in a Chinese Han population (n = 1429) [47]. However, others did not find association for this variant with myocardial infarction in African-American and European-American populations (n = 5201; QOE = C) [48].

#### **NFAT: NFAT2 (NFATC1), NFAT1 (NFATC2) & NFAT4 (NFATC3)**

Screening of all eight coding exons of *NFATC1* in patients with congenital heart disease revealed two nonsynonymous SNP (rs148104245: P66L) and rs113736099: I791L) located, respectively, in exon 2 and 8. The plasmid construct that contained the double mutation coded a protein that failed to translocate to the nucleus (transfected in HeLa cells). Moreover, the mutant NFAT2 (containing each alone or both mutations) showed decreased activation of a target promoter (DEGS1), either alone in combination or when co-transfected with *PPP3CA*. The absence of these SNPs in 100 healthy control individuals suggest they are very rare and might be causing disease [49]. Variants in intronic regions of *NFATC1* (rs11665469, rs2044750, rs7240256 and rs754505) have also been explored in congenital heart diseases, particularly in pediatric populations, but none of the association observed were replicated [50–53].

*In silico* work covering the 2 Kb-range up, downstream and the gene regions of *NFATC1* and *NFATC2* was performed using 'SNP info' software and different prediction scores (Polyphen, ESEfind, miRanda and Match) to predict possible functional variants. The authors selected variants with a MAF >10% in the Chinese Han HapMap population (CHB), nonredundant due to linkage disequilibrium and those predicted as multifunctional (i.e., at least two criteria among the following: located in exonic splicing, transcription-factor binding, or microRNA binding sites, or nonsynonymous SNP). This work suggests six SNPs in *NFATC1* (intronic: rs2581732; synonymous: rs7227107 and rs9966033; 3'UTR: rs9518; 5'UTR: rs9962479; and nonsynonymous: rs754093) and two in *NFATC2* (synonymous: rs6013193; and intronic: rs4811191) as potentially having a functional consequence. However, none of these variants associated with Kawasaki disease



in a Chinese population ( $n = 482$  cases and  $n = 493$  controls) [54]. Another group used *in silico* prediction and proposed a list of nonsynonymous SNPs as candidates for breast cancer susceptibility, including *NFATC1* rs754093; however, this locus has not been tested in association studies [55]. None of these SNPs qualify for a QOE score (Table 2).

To the best of our knowledge, the *NFATC3* variants reported in dbSNP have not been tested in functional or association studies to date.

### Interleukin 2 (*IL2*)

Two common SNPs in *IL2*, promoter rs2069762 (frequently reported as -330 T>G) and exon 1 rs2069763 (synonymous, receiving a variety of designations) have been tested widely and found to associate with a number of outcomes; however, phenotypes have varied across the board. Concerning direct measures of activity, greater expression was found for the minor allele rs2069762-G in a luciferase reporter assay [56]. However, the same group found lower *IL2* mRNA expression from activated peripheral blood lymphocytes in GG carriers compared with GT or TT. Others have found greater *IL2* production (measured by ELISA) in *ex vivo* cultured PBLs from GG carriers following stimulation [57]. *In silico* work suggests that the variant rs2069762 G would reduce the binding affinity at a putative transcription-factor binding site for two transcription factors (TCF-11 and MafG). Similar work suggests that the minor allele rs2069763T would influence binding of the splicing factors SC35, SRp40 and SRp55 in a way that for certain factors binding is enhanced (SRp55), and for others it is eliminated or decreased (SC35, SRp40): the final consequence is difficult to conclude [58]. We rated rs2069762 and rs2069763 with a QOE of A and B, respectively.

Although not strictly in the *IL2* locus, *IL2*-rs6822844 lies far upstream of *IL2* and downstream of *IL12*. A GWAS hit in a Type 1 diabetes association study led to fine sequencing of the region in a very large cohort, but no obvious coding, splice or regulatory variants emerged as causative [59,60]. The SNP appeared in 4q27, within a gene cluster containing four genes: *KIAA1109*, a protein of unknown function with ubiquitous expression; *TENR*, testis nuclear RNA-binding protein, primarily expressed in the testis; *IL2*; and *IL21*. The region exhibits a high degree of linkage disequilibrium in Caucasians. *IL2* and *IL21* exist in separate clusters in Han Chinese individuals [61]. Subsequent tagging SNP approaches in a variety of autoimmune/inflammatory conditions implicated *IL2*-rs6822844, where the minor allele appeared to confer protection for these conditions. Between these studies a variety of additional tagging SNPs were often included, some resulting in significant findings. However, *IL2*-rs6822844 was almost invariably signifi-

cant, and often shown to be in linkage disequilibrium with other significantly associated SNPs (QOE = C).

### Pharmacogenetics of the CNI pathway in SOT

Of the immunophilins, *PPIA* is the only gene tested in SOT. Moscoso-Solorzano *et al.* investigated rs6850 and rs8177826 in 290 renal transplant recipients. The SNPs had no effect on CsA pharmacokinetics. No association was found for acute renal rejection or delayed graft function. Risk of nephrotoxicity (defined as a rise of serum creatinine  $>0.3$  mg/dl within the first 6 months posttransplantation, normalized by CsA dose reduction) associated with the rs8177826 variant. The effect size was important (OR = 3.49; 95% CI [1.47–8.24];  $p = 0.006$ ) and the authors supported their findings with experimental data, purporting a nephrotoxic effect due to increased cyclophilin expression [62]. Moore *et al.* explored the influence of this gene, among others, in a renal transplant population ( $n = 670$ ) employing three intronic *PPIA* tag-SNPs, (rs6970925, rs6463247 and rs9638978) and the two promoter SNPs rs8177826 and rs6850. No association was found for death-censored allograft survival (Kaplan-Meier analyses,  $p > 0.05$ ) [63]. Rs8177826 and rs6850 were designated an LOR of 3 and 4, respectively.

While *NFAT* genes have not been studied in SOT, it is interesting to note that an *NFATC4* variant is associated with new onset diabetes after transplantation (NODAT). *NFATC4* is expressed in pancreatic  $\beta$  cells (along with all the other calcium regulated NFAT proteins) but not in lymphocytes. In a population of 319 hispanic kidney transplant recipients treated with CsA or TAC, oral prednisone (except 45 patients) and MPA, a lower incidence of NODAT in the first post-transplant year was observed in carriers of the *NFATC4* rs10141896-T variant. In multivariate analyses, however, this finding was not significant (HR = 0.45 [0.19–1.01];  $p = 0.054$ ). A protective haplotype emerged with this T allele and the loci rs1955915, rs2243891, rs2295298 and rs222823 (TTTTG haplotype frequency: 5.7 vs 1.9%, in control vs NODAT patients, respectively,  $p = 0.01$ ) [64]. This variant did not qualify our quality of evidence grading system.

Polymorphisms in *IL2* have been explored in SOT outcomes. The rs6822844, with a QOE of C, was studied in a population of Caucasian kidney transplant recipients ( $n = 270$ ). No association was found for acute rejection (occurrence and number of episodes), delayed graft function (need for dialysis within the first 7 days posttransplantation), chronic allograft rejection and evolution of creatinine concentration over 36 months after transplantation [65] (LOR = 3).

Two other *IL2* SNPs, rs2069762 and rs2069763, with QOE scores A and B, respectively, have been the





subject of several investigations. In a study of 90 kidney transplant recipients receiving grafts from living related donors, rs2069763-GG genotype was detected in 36.8% of the patients with acute rejection and in 8.5% of patients without acute rejection (OR = 6.3 [1.8–22.15];  $p = 0.005$ ), while rs2069762 did not associate with the outcomes studied [66]. Another study found higher frequency of rs2069762-TT genotype in renal transplant patients ( $n = 63$ ) experiencing at least one acute rejection episode during the first 3 months post-transplant (80 vs 49%,  $p < 0.05$ ) [67]. The association of rs2069762 with biopsy-proven acute rejection (BPAR) was not detected in seven further studies in renal [68–74] or cardiac transplant [67]. Donor rs2069762 genotype did not impact BPAR and chronic allograft nephropathy likewise found no association [69]. Satoh *et al.* found rs2069762-TT associated with risk of subclinical progressive chronic allograft nephropathy (OR TT vs ‘others’ = 4.57; 95% CI: 1.04–20.11;  $p = 0.044$ ) in 50 renal transplant recipients. Other studies in chronic allograft rejection [75–77] and susceptibility to ‘Panel Reactive Antibody’ desensitization [78] in renal transplant populations likewise found no associations. Based on our grading system, and the number of negative studies reported in SOT, we consider rs2069762 is of doubtful clinical utility (LOR = 4). Regarding the rs2069763, we think it deserves further *in vitro* exploration and clinical investigation in SOT (LOR = 1).

Noceti *et al.* studied the influence of several variants of calcineurin pathway genes *ex vivo*. The inhibition of NFATC1 nuclear translocation, the intracellular expression of IL2 in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and the surface expression of CD25 in CD3<sup>+</sup> cells were measured in stimulated peripheral blood mononuclear cells from 35 volunteers, in basal conditions and after incubation with TAC [14]. In basal conditions, an *IL2RA* haplotype (rs10795791, rs11594656 and rs35285258, ‘AAT’ vs the reference ‘ATC’) associated with decreased CD25 surface expression in CD3<sup>+</sup> cells and increased IL2 intracellular expression in CD4<sup>+</sup> cells. Following tacrolimus treatment, *PPP3CA*-rs45441997 10/10 repeats and *PPIA*-rs8177826 G allele coincided with increased IL2 expression and decreased NFAT translocation in CD4<sup>+</sup> T cells. While these results are of interest, the underlying mechanisms and clinical utility require further exploration.

#### Eligible candidates from genes of the CNI pathway for further pharmacogenetic research on CNI in SOT

In summary, from this review, we could identify seven ‘highly recommended’ candidates in calcineurin, calmodulin or IL2 genes, and one ‘recommended’ candidate in *PPP3R1*. A few other SNPs merit fur-

ther investigations in SOT as ‘potential candidates’ (Table 3). No variants in *NEAT* genes were eligible based on our criteria. Given the literature available, we consider that *PPIA*-rs6850 and *IL2*-rs2069762 should not be investigated further in SOT.

#### The pharmacogenetics of mTORi pharmacodynamics

##### The mTOR pathway and the genes related to mTORi effects

mTORi are inhibitors of the mechanistic (formerly named ‘mammalian’) target of rapamycin (mTOR), a phosphatidylinositol kinase also known as the FRAP. These drugs bind FKBP12, and the complex inhibits the kinase activity of mTOR (Figure 1). mTOR regulates protein synthesis through the phosphorylation and inactivation of the repressor of mRNA translation eukaryotic initiation factor 4EBP1, and through the phosphorylation and activation of p70S6K [79].

The mTOR protein is included in two complexes, mTORC1 and mTORC2, of which only the former is sensitive to mTORi. In mTORC1, mTOR forms a stoichiometric complex with the regulatory-associated protein of mTOR (RAPTOR) and it is associated with a G protein beta-subunit-like protein, the target of rapamycin complex subunit LST8 (mLST8).

In the setting of transplantation, mTORi decrease the cellular response to IL2, reducing lymphocytes proliferation. The mTOR pathway is regulated by the PI3K/AKT kinase system, which is often upregulated in cancers, a frequent complication in transplant patients. This could explain the antineoplastic properties of mTORi, which is not observed with alternate immunosuppressive drugs [79].

Lipid disorders are among the most frequent adverse effects observed with mTORi and might be directly linked to the mTOR downstream signaling pathway, as it integrates inputs from multiple origins including nutrients, energy and insulin. edemas appear to be linked to the impairment of the VEGF-A downstream signal by inhibition of the mTOR/p70S6K pathway by sirolimus [80]. This review will address the major genes related to the mTORi activity: *MTOR*, *RPTOR*, *MLST8* and *RPS6KB1* encoding mTOR, Raptor, mLST8 and the p70S6 kinase, respectively. FKBP12 has been addressed in an earlier section of this review.

#### Genetic variability of the main proteins of the mTOR pathways & promising loci mTOR (*MTOR*)

Most of mTOR SNPs were reported in introns and two in particular have been studied: rs2024627 and rs1883965. Rs2024627 associated with decreased mTOR mRNA expression in colon tissue from healthy



individuals [81]. The SNP associated with colon cancer risk [82]. It was found in linkage disequilibrium with one exonic (synonymous) SNP in the population tested ( $r^2 = 0.71$  and  $D' = 0.85$  in non-Hispanic white cases predominantly) (rs1057079). Through bioinformatic modeling, rs1883965, located in intron 1, was predicted to impact the activity of the *MTOR* binding site [83]. It is in linkage disequilibrium with rs1064261, a coding, synonymous SNP ( $r^2 = 0.864$ , Chinese population), predicted to impact splicing [83]. Rs1883965 was associated with esophageal [83] and gastric cancers in Chinese populations [84] while rs1064261 associated with neuroendocrine tumors in a discovery set of  $n = 261$  cases versus 319 controls (a finding not confirmed in the replication set of  $n = 235$  cases vs 113 controls) [85]. It has a relatively high MAF (0.3063), similar across ethnic groups.

Among *MTOR* SNPs located in the 5'-UTR or the promoter, which may influence transcriptional activity, rs2295080 has been the subject of several investigations. In nonpathologic renal tissue lower mTOR mRNA levels were observed among carriers of the rs2295080-G allele [86]. In addition, reporter assays in three different cell lines (HEK293, 786-o and Hela) demonstrate significantly decreased luciferase activity for this allele [86]. In normal colon tissues no association between this SNP and mTOR mRNA levels was observed. However, rs2295080 associated with increased expression of I $\kappa$ BKB mRNA in colon tissue [81]. I $\kappa$ BKB is a component of the Convergence of Hormones, Inflammation and Energy-Related Factors (CHIEF), which include mTOR, pathway, investigated in relation to colon, rectal and breast cancers [87]. In a meta-analysis on the association of *MTOR* polymorphisms with all-type cancer risk or cancer-related clinical outcomes across ten published reports, the rs2295080 TT (wild-type) genotype associated with increased cancer risk (OR = 1.24; 95% CI: 1.12–1.36;  $p < 0.0005$ ; 5798 cases vs 6244 controls) [88]. In this study, the intronic rs11121704 TT (wild-type) genotype associated with poor clinical outcomes, including death, metastasis and resistance to chemotherapy (OR = 1.53, 95% CI: 1.01–2.32,  $p = 0.044$ ; 1928 cases). However, rs11124704 did not associate with overall and progression-free survival in advanced esophageal squamous cell carcinoma ( $n = 334$ ) [89].

*In silico* explorations suggest rs2536 in the 3'UTR may influence miRNA binding [90] and thus destabilize mRNA or inhibit their translation into proteins. In the above-mentioned meta-analysis, rs2536 did not significantly associate with cancer risk, in line with another report in eastern Chinese individuals, not included in the meta-analysis [84]. However, rs2536 was associated with a significantly decreased risk of

childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population (OR = 0.67, 95% CI [0.46–0.96]) [91]. The SNP deserves further investigation.

Finally, the *MTOR* gene locus was associated with corneal curvature, a key determinant of major eye diseases such as keratoconus, myopia and corneal astigmatism across four genome-wide association studies including 10,000 samples from three populations (Malay, Indian and Chinese) [92]. Several SNPs in *MTOR* associated with this phenotype, including the aforementioned rs2536 and rs1057079. The intronic rs17036350 displayed the strongest association with a meta-analysis  $p$ -value of  $4.06 \times 10^{-13}$ . Although these results do not confirm a causative functionally relevant polymorphism, the association of the locus for this phenotype is compelling.

### The regulatory associated protein of mTOR (RPTOR)

Nineteen SNPs in *RPTOR* and nearby region have been cited in scientific reports (2 in exons, 13 in introns, 1 in the *RPTOR* 5' UTR and 3 in its 3' UTR). One common synonymous SNP in exon 14 (rs2289759) was predicted *in silico* to influence splicing, favoring the expression of RAPTOR\_v2, a splicing variant in which exons 14–17 are not transcribed to mRNA [93]. RAPTOR\_v2 lacks the HEAT (i.e., Huntingtin, elongation factor 3 (EF3), PP2A, and the yeast kinase TOR1 repeat domain involved in protein–protein interactions: the splicing variant would retain the capacity to bind mTOR but not p70S6K1 and 4EBP1. Whether the RAPTOR\_v2 expression level or the occurrence of the rs2289759 SNP has functional or phenotypic effects is currently unknown.

Most studies investigating *RPTOR* variants combined several genes of the mTOR pathway (e.g., *MLST8*, *MTOR*, *AKT*). Chen *et al.* evaluated 231 SNPs in 19 genes of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in 803 urinary bladder cancer cases and 803 controls, all of non-Hispanic Caucasian origin [94]. Of 24 potentially significant associations ( $p < 0.05$ ), 17 concerned *RPTOR*. After adjustment for multiple testing, four common variants in *RPTOR* (rs11653499, rs7211818, rs7212142 and rs9674559) remained significant (OR: 1.57–2.05), giving rise to two haplotypes associated with elevated risk. In a subsequent study with a similar approach (289 SNPs in 20 genes), the same group identified *RPTOR* rs9906827 (intron 3), as well as two other variants of the PI3K/AKT/mTOR pathway, associated with survival in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients [95].

Zhu *et al.* tested *RPTOR* rs3751934, rs1062935, rs3751932 and rs12602885 for association with esophageal squamous cell carcinoma and found





rs12602885 associated with risk (AA vs GG: OR = 0.68; 95% CI 0.47–0.98;  $p = 0.040$ ) [83]. SNPs in *MLST8* ( $n = 2$ ) and *MTOR* ( $n = 2$ ) were also included. *MTOR* rs1883965 was the main single susceptibility locus. The same group tested the same 4 *RPTOR* SNPs in gastric cancer but found no significant association [84].

Two additional SNP in *RPTOR* were identified as part of the top 25 SNPs associated to the risk of otitis media in childhood in a discovery GWAS including 256 cases vs 575 controls) [96], but this was not confirmed in a second study [97].

#### mTOR-associated protein LST8 (*MLST8*)

Kim *et al.* showed using loss-of-function experiments based on small interfering RNA that mLST8 is necessary for mTOR-mediated signaling: mTORC1 complexes without mLST8 did not respond to nutrients or bind sirolimus [98]. He *et al.* highlighted two polymorphisms from the SNPinfo web server [99]: rs3160, rs26865. The former, located in the 3' UTR region, is purported to affect miRNA binding, and the latter, located in the 5' near gene region, is located in a transcription factor binding site [84]. Both polymorphisms have similar MAF among Caucasian and Asian populations (~0.5). No functional investigations have been reported to date. The SNPs were investigated as potential risk factors for gastric cancer in an eastern Chinese population: no association was found [84]. The same group found no association between the same SNPs and risk of esophageal squamous cell carcinoma, likewise in eastern Chinese individuals [83].

#### Ribosomal protein S6 kinase 70-KD (p70 S6 kinase; *RPS6KB1*)

Seven SNPs have been investigated in this gene: five intronic and two in the 3' UTR region. Two are located in putative transcriptional binding sites (rs8071475, rs1292034) [81]. No functional investigations have been performed to date. Slatter *et al.* used the data from two large case-control studies on rectal and colon cancers to study genes of the RPS6K family. Six tag SNPs were used to cover *RPS6KB1* (rs8071475, rs1292033, rs180535, rs180531, rs180519, rs180515) [100]. None associated with cancer risk. Significant statistical interactions were found between the effect of variants in *RPS6KB1* and others located in genes within the PI3K/Akt/mTOR pathway, suggesting that genetic variation in this particular gene might influence the pathway. More recently, as part of a broader study on the CHIEF pathway, the same authors found *RPS6K1* rs8071475 influences the expression of *STK11* in normal colon tissue (a gene involved in mTOR pathway downregulation). On the

other hand, several variants in genes of the CHIEF pathway appear to impact *RPS6K1* expression in the colon [81]. These associations were specific to colon tissue and their impact on clinically relevant phenotypes remains to be elucidated.

#### Pharmacogenetics of the mTOR pathway in SOT

Variants in *MTOR*, *RPS6KB1* and *RPTOR* have been tested in a renal transplant cohort of individuals switched from CNI to SIR at least three months posttransplantation ( $n = 113$  discovery group;  $n = 66$  validation group) [101]. A tag-SNP approach was used for *MTOR* and *RPS6KB1*: 5 SNPs in each gene were selected from HapMap, allowing discrimination of the major haplotypes. Two of the tag-SNPs in *RPS6K1* may affect transcription sites (rs8071475 and rs1292034, described in the previous section) [81]. Four SNP in *RPTOR* were selected based on the literature reports (rs2289759, rs7212142, rs7211818 and rs11653499; described in the previous section) [90,94,102]. A significant association was found between a variant haplotype of *MTOR* and decreased hemoglobin levels in both discovery and validation populations (rs1770345, rs2300095, rs2076655, rs1883965 and rs12732063). Importantly, the association with hemoglobin levels was observed prior to, at the time of the switch, and subsequently, suggesting a physiological rather than pharmacogenetic mechanism. Furthermore, the effect size was minor (difference in hemoglobin levels of ~ 1g/dl). No variants were found associated with other sirolimus adverse effects including dyslipidemia, oedemas and cutaneous reactions [101].

#### Eligible candidates for further pharmacogenetic research on mTORi in SOT

In summary, we identify three variants in *MTOR*, which our grading system deem 'highly recommended candidates' (rs2024627 and rs2295080, not yet investigated in SOT, and rs1883965 with a positive association in SOT). *MTOR*-rs1057079 (in linkage disequilibrium with rs2024627) is also a 'potential candidate' (Table 3).

#### The pharmacogenetics of MPA pharmacodynamics

##### Genes related to the effects of MPA

Lymphocytes are dependent on IMPDH for DNA synthesis. This rate-limiting enzyme is involved in *de novo* purine synthesis and has two isoforms encoded by *IMPDH1* and *IMPDH2*. Mycophenolic acid is a fivefold more potent inhibitor of IMPDH2 (Figure 1), which is expressed in activated lymphocytes as compared with IMPDH1, which is expressed in most cell types [103]. *IMPDH2* protein shares 84% homology with the type 1 isoform.

Table 3. Candidate SNPs related to the pharmacodynamics pathways of immunosuppressive drugs with quality of evidence of existing data and level of recommendation for future work.

Drugs	Gene	SNP	MAF <sup>†</sup>	QOE	LOR
Calcineurin inhibitors	<i>PPIA</i>	rs8177826	G = 0.033	C	3
		rs6850	G = 0.384	D	4
	<i>PPP3CA</i>	rs45441997	GGC(10) = 0.268	A	1
		rs3804358	C = 0.133 <sup>‡</sup>	A	1
	<i>PPP3CB</i>	rs3763679	T = 0.066	A	1
	<i>PPP3R1</i>	rs3039851	NA	B	2
		rs1868402	G = 0.301	A	1
	<i>CALM1</i>	rs12885713	T = 0.400	A	1
	<i>CALM3</i>	rs150954567	NA	A	1
		rs3213718	C = 0.358	C	3
		rs3814843	C = 0.018	C	3
	<i>IL2</i>	rs2069762	G = 0.232	A	4
		rs2069763	A = 0.400	B	1
		rs6822844	T = 0.146	C	3
mTOR inhibitors	<i>MTOR</i>	rs2024627	T = 0.270	A	1
		rs2295080	G = 0.308	A	1
		rs1883965	A = 0.288	B	1
		rs1057079	G = 0.243	C	3
Mycophenolic acid	<i>IMPDH2</i>	rs11706052	G = 0.115	A	1
	<i>IMPDH1</i>	rs2278293	A = 0.431	C	4
		rs2278294	A = 0.323	C	4

<sup>†</sup>Reported MAF in Caucasians (HapMap CEU individuals).  
<sup>‡</sup>Not found in Caucasians, but present in Asians (Han Chinese in Beijing reported MAF).  
Level of recommendation: 1 = Highly recommended candidate; 2 = Recommended candidate; 3 = Potential candidate; 4 = Candidate to exclude.  
LOR: Level of recommendation; MAF: Minor allele frequency; NA: Not available; QOE: Quality of evidence.

### Genetic variability of MPA targets and promising loci

#### IMPDH2 (*IMPDH2*)

Of all *IMPDH2* SNPs submitted to date in the NCBI dbSNP (Table 1), several have not been confirmed in resequencing projects and thus may be extremely rare or represent sequencing errors [104–106]. Mohamed *et al.* investigated rs4974081, rs5848860, and rs11557540 in more than 400 DNA samples from four different ethnic groups (Caucasians, African–Americans, Hispanics and Asians): rs5848860 and rs11557540 were not found [106]. Furthermore, a wide variation in allele frequencies across ethnic groups has been observed. For instance, Wu *et al.* identified 25 *IMPDH2* SNPs: 12 in African–Americans, nine in Caucasian–Americans and four in Han Chinese–Americans. Only one of these SNPs was observed in all three populations [105].

Unambiguous functional data are available for two *IMPDH2* SNPs: a nonsynonymous SNP located in

*IMPDH2* exon 7 (rs121434586; usually referred to as c.787C>T) and a promoter SNP (c.-95C>T, not yet referenced in the dbSNP) located in the CRE(A) transcription factor binding site (cAMP response element) [107]. The rs121434586 variant dramatically decreased the catalytic activity of recombinant *IMPDH2* [108]. The c.-95C>T SNP demonstrated decreased luciferase activity in two different cell lines [107]. In addition, *in silico* functional analysis predicted that another *IMPDH2* promoter SNP (rs4974081) could be located at a potential transcription factor binding site [106].

#### IMPDH1 (*IMPDH1*)

While there are 283 *IMPDH1* coding SNPs reported in dbSNP, Wu *et al.* identified 73 SNPs in 288 individuals from three ethnic groups (African–American, Caucasian–American and Han Chinese–American) across exons, intron–exon splice junctions and a portion of the 5′-flanking region, of which nine were in





the coding region, four of these nonsynonymous [105]. Once again SNP frequencies vary across ethnic groups. Among the four nonsynonymous *IMPDH1* SNPs, rs72624960 in exon 8 (S<sup>275</sup>L) was found to be associated with a drastic decrease in enzyme activity *in vitro* (<25% of the wild-type enzyme), caused by accelerated protein degradation [105]. Molecular modeling showed that the amino acid substitution resulting from this SNP might compromise protein folding, tetramerization and thus stability [105]. The SNP was only found in Han Chinese-Americans.

Apart from being a secondary target of MPA, *IMPDH1* is involved in the enzymatic activation of 6-mercaptopurine (the active moiety of azathioprine) to 6-thioguanine nucleotides. It has been suggested that *IMPDH1* genetic variations could contribute to resistance to AZA in patients with inflammatory bowel disease: Roberts *et al.* screened *IMPDH1* and *IMPDH2* in 20 azathioprine-resistant patients and found a 9 bp insertion within *IMPDH1* P3 promoter in one patient. The insertion was predicted to abolish a cAMP-response element (CRE) and was found to significantly reduce *IMPDH1* promoter activity in a luciferase reporter gene assay [109]. The authors did not find carriers among 301 individuals suggesting that the mutation would either be extremely rare or specific to inflammatory bowel disease patients. This SNP has not been reported in dbSNP.

Another *IMPDH1* SNP (rs4731449) located in an intron associated with survival (HR = 1.96;  $p = 7.89 \times 10^{-3}$ ) in a cohort of Caucasian children suffering from acute lymphoblastic leukemia. The authors found another SNP (rs4731448) located 319 bases upstream rs4731449 purported to decrease TPMT erythrocyte activity in those patients (no association was found with rs4731449) [110]. These associations have not been replicated so far.

### Pharmacogenetics of IMPDH in SOT *IMPDH2*

The two *IMPDH2* above-mentioned functional SNPs (c.-95C>T and c.787C>T) have either not been investigated in clinical settings or not found when explored [104]. Given their extremely low allelic frequency (<1%) [107,108], these are unlikely to contribute to the wide inter-patient variability in MPA effects observed clinically, but might possibly be the cause of unexplained effects in a few individuals.

Rs4974081 is frequently found in Caucasians (HapMap CEU panel MAF = 0.300) but is absent in Asians and found at low frequencies in other ethnic groups (e.g., HapMap YRI, sub-Saharan African, panel MAF = 0.093). No association between this SNP and clinical outcomes of MPA (BPAP occurrence,

leucopenia and infections) was found in 456 Caucasian renal transplant recipients [104].

A SNP located in *IMPDH2* intron 7 (rs11706052, usually referred to as 3757T>C) has been extensively studied with as many positive as negative associations reported. Grinyò *et al.* were the first to report a significant association between this SNP and the risk of BPAP in 237 *de novo* renal transplant recipients (OR: 3.39; 95% CI [1.42–8.09];  $p = 0.006$ ) [71]. Two subsequent studies suggest that it may be associated with a poor response to MPA. The first study, conducted in 80 renal transplanted patients treated with MMF, reported an increased IMPDH activity in carriers of the variant allele (C) as compared with noncarriers (IMPDH interdose activity: 336; 95% CI: [216–521] vs 227, 95% CI: [198–260]  $\mu\text{mol}$  xanthosine-monophosphate produced/second/mol adenosine monophosphate;  $p = 0.04$ ) while pretransplant IMPDH activity, thus prior to MPA treatment, was similar in the two genotype groups [111]. The second study was conducted in healthy volunteers: rs11706052 was found to reduce the antiproliferative effect of MPA on lymphocytes by approximately 50% ( $n = 8$  carriers of rs11706052 vs 12 noncarriers) [112]. A third study sought to replicate the association between this SNP and the risk of acute kidney rejection in a large cohort of 969 kidney transplant recipients. The authors found a modest association, which was not significant with adjustment for multiple testing [72].

In pediatric heart transplant recipients, the rs11706052 variant surprisingly associated with more frequent neutropenia requiring dose withholding ( $p = 0.046$ ) [113]. This contradicts previous work demonstrating a poorer response to MPA [111,112], as well as, specifically, higher lymphocyte counts and a reduced incidence of lymphopenia among kidney allograft recipients ( $n = 177$ ) [114]. Furthermore, the association with the risk of acute rejection was not confirmed in at least three studies in relatively large groups of renal transplant recipients (191, 456 and 1040 patients) [104,115,116]. Shah *et al.* also demonstrated that this SNP has no impact on MMF dose tolerated at 1 year or on graft or patient survival at 5 years [116].

### *IMPDH1*

Two SNPs within *IMPDH1* intron 7 (rs2278293 and rs2278294), not predicted to affect IMPDH1 function, have been investigated widely. These associated with a decreased risk of BPAP following the first year after renal transplantation [115] (OR = 0.34 for rs2278293; 95% CI [0.15–0.76];  $p = 0.008$ , and 0.40 for rs2278294; 95% CI [0.18–0.89];  $p = 0.02$ ). In another study in renal transplant recipients, protection from BPAP was demonstrated only for rs2278294



(OR: 0.54; 95% CI [0.34–0.85];  $p = 0.0075$ ) [104]. Carriers of the rs2278294 variant also had a 1.6-fold increased risk of leucopenia, reinforcing the direction of the functional effect. A third study in 82 Japanese renal transplant recipients found no association between rs2278294 or rs2278293 and the incidence of subclinical acute rejection diagnosed by a biopsy examination 29 days after transplantation [117]. However, when the authors stratified their analysis of the 24h MPA AUC into day- and night-time periods, rs2278293 influenced subclinical acute rejection in individuals with high night-time exposure to MPA ( $>60\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ ). A similar trend was observed in patients with high day-time exposure. Finally, two studies in large cohorts of renal transplant recipients ( $n = \sim 1000$ ) found no association of rs2278293 or rs2278294 with acute rejection [72,116], and on MMF dose tolerated at 1 year, or graft or patient survival at 5 years [116].

The rs2278294 variant was further investigated in MPA adverse effects. Two studies in pediatric heart transplant recipients combined rs2278294 and rs2228075 into haplotypes, and demonstrated an association with MMF gastrointestinal intolerance defined using relatively robust criteria. Of note is that no difference was observed in the average daily MMF dose or MPA plasma levels between patients experiencing GI complications compared with those without symptoms [113,118].

#### Eligible candidates for further pharmacogenetic research on MPA in SOT

In summary, most of the studies conducted so far on IMPDH genetic variability have concerned the pharmacogenetics of MPA and several variants have been investigated. Although controversial data is available in SOT regarding *IMPDH2*-rs11706052, it remains a ‘highly recommended’ candidate. The data regarding *IMPDH1*-rs2278294 and rs2278293 are also controversial and the mechanistic rationale for their effect is much less clear. The most recent investigations tend to demonstrate that their impact of MPA-related outcomes is not relevant [72,116] and suggest that these two variants should not be considered further (Table 3).

#### Conclusion & future perspective

Pharmacogenetics is increasingly being incorporated as part of the services of hospital laboratories, and SOT one of the few clinical areas already applying knowledge from this field for treatment personalization. This has required enormous research efforts, and long periods for sufficient evidence to justify clinical use implementation in the clinic. For instance, it took almost 10 years following the first description of the loss-of-function allele of cytochrome P450 3A5 [119], first described in 2001, to perform a randomized trial

demonstrating that genotyping may be useful for initial dose adjustment of TAC [120]. Despite this clear demonstration, numerous well-conducted retrospective studies and recent official recommendations [121], CYP3A5 genotyping is still not systematically performed in this context since clinical usefulness remains a subject of debate.

The phenotypes most commonly studied in the pharmacogenetics of SOT have been acute and chronic rejections. New onset diabetes after transplantation (NODAT) is also considered a serious adverse effect of immunosuppressive therapy, especially with tacrolimus. While association with *NEATC4* rs10141896 has been reported [64], to date other genes from the calcineurin pathway have not been the subject of investigation for this phenotype. Kim *et al.* analyzed the association between NODAT and a panel of SNPs in ten interleukin and receptor genes within a Korean population, and found significant associations for variants in IL-7R, IL-17E, IL-17R and IL-17RB: these loci had exhibited previous associations with Type 2 diabetes mellitus [122], but have never been the object of other transplantation studies. On the contrary, *TCF7L2*-rs7903146 may be more promising as it associated with NODAT in a Korean [123] and two Caucasian populations [124,125], even if other authors did not find association [126–129]. *TCF7L2* codes for the transcription factor 7-like 2 protein, which is involved in blood glucose homeostasis. With an MAF = 0.279 in Caucasians, this intronic SNP is already known as one of the most significant genetic risk factors of Type 2 diabetes mellitus [130] as well as of gestational diabetes [131].

Part of the purpose of this article is to highlight that comprehensive data regarding the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drug is limited, and there is, therefore, a long way to go before these variants are fully characterized, and even further to demonstrate clinical utility in SOT for some of them, if any.

We identify here a few ‘recommended’ or ‘highly recommended’ variant candidates in the major genes related to immunosuppressive pathways of immunosuppressive drugs. It is possible that some interesting ones were missed. Specifically, we did not address important pharmacogenes such as IL2 receptors for a number of reasons. While *IL2RA* is the most widely studied, all three IL2 receptor genes are relevant. In the present review we focused on the genes immediately adjacent to the pharmacological activity of calcineurin inhibitors (drug targets, namely cyclophilins and proteins that interact with this complex directly). *IL2* was relevant to include as the primary effector of the calcineurin pathway blocked by CNI, and the subject of investigations for outcomes in SOT.





It is likely that a number of rare variants, not yet identified, might explain drug response phenotypes in SOT, particularly those that are severe with a well characterized diagnosis. The current trend in pharmacogenetic research is to focus on known, functional and relatively frequent variants, but such an approach may change in the next few years with the advent of Next-Generation Sequencing (NGS). The concept behind NGS is not revolutionary: the bases of a small fragment of DNA are sequentially identified from signals emitted when a DNA fragment is re-synthesized from a template strand. The revolution is that However NGS systems permit millions of reactions performed in a massively parallel fashion, which enables rapid sequencing of large stretches of DNA base pairs spanning a large region of the genome. This promises to be particularly interesting in contexts involving large signaling pathways. The cost of NGS remains too high to envisage studies on large populations in our laboratories, but will undoubtedly decrease and thus become more accessible. NGS therefore represents an opportunity for future research in pharmacogenetics, with the potential to uncover phar-

macodynamic candidate genes, and particularly in this less explored field of genes, among others, which have been a challenge to investigate to date.

#### Financial & competing interests disclosure

The authors have received funding for their research activities from Astellas, Novartis and Roche. P Marquet is or was a consultant for Astellas, Chiesi, Novartis and Sandoz. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

#### Executive summary

##### The pharmacogenetics of calcineurin inhibitors pharmacodynamics

- *IL2* has been the most studied gene of the calcineurin pathway in solid organ transplantation (SOT).
- Four variants in calcineurin isoforms (*PPP3CA*-rs45441997 and rs3804358, *PPP3CB*-rs3763679, *PPP3R1*-rs1868402), two in calmodulin genes (*CALM1*-rs12885713, *CALM3*-rs150954567) and one in *IL2* (rs2069763) are 'highly recommended' candidates.
- *PPP3R1*-3039851 also merits further investigations in SOT ('recommended' candidate).
- *PP1A*-rs8177826, *CALM3*-rs3213718 and rs3814843, as well as *IL2*-6822844 are 'potential' candidates.

##### The pharmacogenetics of mTOR inhibitors pharmacodynamics

- Three variants in *MTOR* are 'highly recommended' candidates: rs2024627, rs2295080 and rs1883965.
- Rs1883965 is part of a haplotype found to associate with decreased hemoglobin levels in SOT.
- No relevant candidate variants were found in *RPTOR*, *MLST8* or *RP6SK1*.

##### The pharmacogenetics of mycophenolic acid pharmacodynamics

- Several variants in *IMPDH* have been investigated in SOT in drug regimens containing mycophenolic acid.
- Although controversial clinical data is available for *IMPDH2*-rs11706052, it remains a 'highly recommended' candidate as it impacts *IMPDH* activity *ex vivo*, as well as the anti-proliferative effect of mycophenolic acid on lymphocytes.
- *IMPDH1*-rs2278294 and rs2278293 should not be considered further as candidates in SOT outcomes.

#### References

- Kim HP, Imbert J, Leonard WJ. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17(5), 349–366 (2006).
- Handsbumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, Speicher DW. Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science.* 226(4674), 544–547 (1984).
- MacMillan D. FK506 binding proteins: cellular regulators of intracellular  $Ca^{2+}$  signalling. *Eur. J. Pharmacol.* 700(1–3), 181–193 (2013).
- Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* 80(4), 1483–1521 (2000).
- Jiang H, Xiong F, Kong S, Ogawa T, Kobayashi M, Liu JO. Distinct tissue and cellular distribution of two major isoforms of calcineurin. *Mol. Immunol.* 34(8–9), 663–669 (1997).
- Kuno T, Mukai H, Ito A *et al.* Distinct cellular expression of calcineurin A alpha and A beta in rat brain. *J. Neurochem.* 58(5), 1643–1651 (1992).
- Bueno OF, Brandt EB, Rothenberg ME, Molkentin JD. Defective T cell development and function in calcineurin A beta-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(14), 9398–9403 (2002).

- 8 Zhang BW, Zimmer G, Chen J *et al.* T cell responses in calcineurin A alpha-deficient mice. *J. Exp. Med.* 183(2), 413–420 (1996).
- 9 Liu JO. Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcriptional corepressors involved in T-cell activation. *Immunol. Rev.* 228(1), 184–198 (2009).
- 10 Kortvely E, Gulya K. Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sci.* 74(9), 1065–1070 (2004).
- 11 Crotti L, Johnson CN, Graf E *et al.* Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. *Circulation.* 127(9), 1009–1017 (2013).
- 12 Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* 5(6), 472–484 (2005).
- 13 Xing Y, Ichida F, Matsuoka T *et al.* Genetic analysis in patients with left ventricular noncompaction and evidence for genetic heterogeneity. *Mol. Genet. Metab.* 88(1), 71–77 (2006).
- 14 Noceti OM, Woillard J-B, Boumediene A *et al.* Tacrolimus pharmacodynamics and pharmacogenetics along the calcineurin pathway in human lymphocytes. *Clin. Chem.* 60(10), 1336–1345 (2014).
- 15 Biagi DG, Mill JG, Mansur AJ, Krieger JE, Pereira AC. A negative screen for mutations in calstabin 1 and 2 genes in patients with dilated cardiomyopathy. *J. Negat. Results Biomed.* 11, 4 (2012).
- 16 Zhou T, Zhang W, Sweiss NJ *et al.* Peripheral blood gene expression as a novel genomic biomarker in complicated sarcoidosis. *PLoS ONE* 7(9), e44818 (2012).
- 17 An P, Wang LH, Hutcheson-Dilks H *et al.* Regulatory polymorphisms in the cyclophilin A gene, *PPIA*, accelerate progression to AIDS. *PLoS Pathog.* 3(6), e88 (2007).
- 18 Moscoso-Solorzano GT, Ortega F, Rodríguez I *et al.* A search for cyclophilin-A gene variants in cyclosporine A-treated renal transplanted patients. *Clin. Transplant.* 22(6), 722–729 (2008).
- 19 Palacín M, Rodríguez I, García-Castro M *et al.* A search for cyclophilin-A gene (*PPIA*) variation and its contribution to the risk of atherosclerosis and myocardial infarction. *Int. J. Immunogenet.* 35(2), 159–164 (2008).
- 20 Rits MAN, van Dort KA, Kootstra NA. Polymorphisms in the regulatory region of the Cyclophilin A gene influence the susceptibility for HIV-1 Infection. *PLoS ONE* 3(12), e3975 (2008).
- 21 Bleiber G, May M, Martinez R *et al.* Use of a combined *ex vivo* in *vivo* population approach for screening of human genes involved in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 life cycle for variants influencing disease progression. *J. Virol.* 79(20), 12674–12680 (2005).
- 22 Fellay J, Ge D, Shianna KV *et al.* Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. *PLoS Genet.* 5(12), e1000791 (2009).
- 23 Rits MAN, van Dort KA, Kootstra NA. Polymorphisms in the regulatory region of the cyclophilin A gene influence the susceptibility for HIV-1 infection. *PLoS ONE* 3(12), e3975 (2008).
- 24 Chiocco MJ, Zhu X, Walther D *et al.* Fine mapping of calcineurin (*PPP3CA*) gene reveals novel alternative splicing patterns, association of 5'UTR trinucleotide repeat with addiction vulnerability, and differential isoform expression in Alzheimer's disease. *Subst. Use Misuse* 45(11), 1809–1826 (2010).
- 25 Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Oda Y, Tomizawa K, Gong C-X. Truncation and activation of calcineurin A by calpain I in Alzheimer disease brain. *J. Biol. Chem.* 280(45), 37755–37762 (2005).
- 26 Liu Q-R, Drgon T, Walther D *et al.* Pooled association genome scanning: validation and use to identify addiction vulnerability loci in two samples. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102(33), 11864–11869 (2005).
- 27 Poirier O, Nicaud V, McDonagh T *et al.* Polymorphisms of genes of the cardiac calcineurin pathway and cardiac hypertrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* 11(9), 659–664 (2003).
- 28 Gabrovska PN, Smith RA, Haupt LM, Griffiths LR. Investigation of two Wnt signalling pathway single nucleotide polymorphisms in a breast cancer-affected Australian population. *Twin Res. Hum. Genet.* 14(6), 562–567 (2011).
- 29 He Z-H, Hu Y, Wang H-Y *et al.* Are calcineurin genes associated with endurance phenotype traits? *Eur. J. Appl. Physiol.* 109(3), 359–369 (2010).
- 30 He Z-H, Hu Y, Li Y-C, Bao D-P, Ruiz J, Lucia A. Polymorphisms in the calcineurin genes are associated with the training responsiveness of cardiac phenotypes in Chinese young adults. *Eur. J. Appl. Physiol.* 110(4), 761–767 (2010).
- 31 He Z-H, Hu Y, Li Y-C *et al.* Are calcineurin genes associated with athletic status? A function, replication study. *Med. Sci. Sports Exerc.* 43(8), 1433–1440 (2011).
- 32 Tang W, Amett DK, Devereux RB *et al.* Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin B (*PPP3R1*) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy. *Am. Heart J.* 150(4), 845–851 (2005).
- 33 Ahmetov I, Williams A, Popov D *et al.* The combined impact of metabolic gene polymorphisms on elite endurance athlete status and related phenotypes. *Hum. Genet.* 126(6), 751–761 (2009).
- 34 Cruchaga C, Kauwe JSK, Mayo K *et al.* SNPs Associated with cerebrospinal fluid phospho-tau levels influence rate of decline in Alzheimer's disease. *PLoS Genet.* 6(9), e1001101 (2010).
- 35 Nyegaard M, Overgaard MT, Søndergaard MT *et al.* Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am. J. Hum. Genet.* 91(4), 703–712 (2012).
- 36 Marsman RF, Barc J, Beekman L *et al.* A mutation in *CALM1* encoding calmodulin in familial idiopathic ventricular fibrillation in childhood and adolescence. *J. Am. Coll. Cardiol.* 63(3), 259–266 (2014).
- 37 Mototani H, Mabuchi A, Saito S *et al.* A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of *CALM1* is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum. Mol. Genet.* 14(8), 1009–1017 (2005).
- 38 Zhao D, Qiu G, Wang Y, Zhang J, Shen J, Wu Z. Association between adolescent idiopathic scoliosis with double curve and polymorphisms of calmodulin1 gene/estrogen receptor- $\alpha$  gene. *Orthop. Surg.* 1(3), 222–230 (2009).





- 39 Zhuang Q, Wu Z, Qiu G. Is polymorphism of *CALM1* gene or growth hormone receptor gene associated with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis? *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 87(31), 2198–2202 (2007).
- 40 Valdes AM, Loughlin J, Oene MV *et al*. Sex and ethnic differences in the association of *ASPN*, *CALM1*, *COL2A1*, *COMP*, and *FRZB* with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 56(1), 137–146 (2007).
- 41 Loughlin J, Sinsheimer JS, Carr A, Chapman K. The *CALM1* core promoter polymorphism is not associated with hip osteoarthritis in a United Kingdom Caucasian population. *Osteoarthritis Cartilage*. 14(3), 295–298 (2006).
- 42 Mototani H, Iida A, Nakamura Y, Ikegawa S. Identification of sequence polymorphisms in *CALM2* and analysis of association with hip osteoarthritis in a Japanese population. *J. Bone Miner. Metab.* 28(5), 547–553 (2010).
- 43 Murea M, Lu L, Ma L *et al*. Genome-wide association scan for survival on dialysis in African-Americans with Type 2 diabetes. *Am. J. Nephrol.* 33(6), 502–509 (2011).
- 44 Friedrich FW, Bausero P, Sun Y *et al*. A new polymorphism in human calmodulin III gene promoter is a potential modifier gene for familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* 30(13), 1648–1655 (2009).
- 45 Luke MM, Kane JP, Liu DM *et al*. A polymorphism in the protease-like domain of apolipoprotein(a) is associated with severe coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27(9), 2030–2036 (2007).
- 46 Luke MM, O'Meara ES, Rowland CM *et al*. Gene variants associated with ischemic stroke: the cardiovascular health study. *Stroke J. Cereb. Circ.* 40(2), 363–368 (2009).
- 47 Liu Z, Liu X, Yu H *et al*. Common variants in *TRDN* and *CALM1* are associated with risk of sudden cardiac death in chronic heart failure patients in Chinese Han population. *PLoS ONE* 10(7), e0132459 (2015).
- 48 Shiffman D, O'Meara ES, Bare LA *et al*. Association of gene variants with incident myocardial infarction in the cardiovascular health study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28(1), 173–179 (2008).
- 49 Abdul-Sater Z, Yehya A, Beresian J *et al*. Two heterozygous mutations in *NFATC1* in a patient with Tricuspid Atresia. *PLoS ONE* 7(11), e49532 (2012).
- 50 Gu H, Gong J, Qiu W *et al*. Association of a tandem repeat polymorphism in *NFATc1* with increased risk of perimembranous ventricular septal defect in a Chinese population. *Biochem. Genet.* 49(9–10), 592–600 (2011).
- 51 Yehya A, Souki R, Bitar F, Nemer G. Differential duplication of an intronic region in the *NFATC1* gene in patients with congenital heart disease. *Genome* 49(9), 1092–1098 (2006).
- 52 Shen L, Li Z, Shen A-don *et al*. Association of *NFATc1* gene polymorphism with ventricular septal defect in the Chinese Han population. *Chin. Med. J. (Engl.)* 126(1), 78–81 (2013).
- 53 Cho S, Kim H, Oh S, Kim K, Park T. Elastic-net regularization approaches for genome-wide association studies of rheumatoid arthritis. *BMC Proc.* 3(Suppl. 7), S25 (2009).
- 54 Wang W, Lou J, Zhong R *et al*. The roles of  $Ca^{2+}$ /NFAT signaling genes in Kawasaki disease: single- and multiple-risk genetic variants. *Sci. Rep.* 4, 5208 (2014).
- 55 Savas S, Schmidt S, Jarjanazi H, Ozcelik H. Functional nsSNPs from carcinogenesis-related genes expressed in breast tissue: potential breast cancer risk alleles and their distribution across human populations. *Hum. Genomics* 2(5), 287–296 (2006).
- 56 Matesanz F, Fedetz M, Leyva L, Delgado C, Fernández O, Alcina A. Effects of the multiple sclerosis associated -330 promoter polymorphism in *IL2* allelic expression. *J. Neuroimmunol.* 148(1–2), 212–217 (2004).
- 57 Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E *et al*. Association of cytokine polymorphic inheritance and *in vitro* cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72(8), 1444–1450 (2001).
- 58 Christensen U, Haagerup A, Binderup HG, Vestbo J, Kruse TA, B[oslash]rglum AD. Family based association analysis of the *IL2* and *IL15* genes in allergic disorders. *Eur. J. Hum. Genet.* 14(2), 227–235 (2005).
- 59 Burton PR, Clayton DG, Cardon LR *et al*. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447(7145), 661–678 (2007).
- 60 Todd JA, Walker NM, Cooper JD *et al*. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of Type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 39(7), 857–864 (2007).
- 61 Shi J, Zhou L, Zhernakova A *et al*. Haplotype-based analysis of ulcerative colitis risk loci identifies both *IL2* and *IL21* as susceptibility genes in Han Chinese. Haplotype-based analysis of ulcerative colitis risk loci identifies both *IL2* and *IL21* as susceptibility genes in Han Chinese. *Inflamm. Bowel Dis. Inflamm. Bowel Dis.* 17(12), 2472–1479 (2011).
- 62 Moscoso-Solorzano GT, Ortega F, Rodríguez I *et al*. A search for cyclophilin-A gene variants in cyclosporine A-treated renal transplanted patients. *Clin. Transplant.* 22(6), 722–729 (2008).
- 63 Moore J, McKnight AJ, Döhler B *et al*. Donor *ABCB1* variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 23(11), 1891–1899 (2012).
- 64 Chen Y, Sampaio MS, Yang JW, Min D, Hutchinson IV. Genetic polymorphisms of the transcription factor NFATc4 and development of new-onset diabetes after transplantation in Hispanic kidney transplant recipients. *Transplantation* 93(3), 325–330 (2012).
- 65 Kwiatkowska E, Domanski L, Kłoda K, Pawlik A, Safranow K, Ciechanowski K. *IL2-IL21* gene cluster polymorphism is not associated with allograft function after kidney transplantation. *Int. Urol. Nephrol.* 46(12), 2415–2420 (2014).
- 66 Seyhun Y, Mytilineos J, Turkmen A *et al*. Influence of cytokine gene polymorphisms on graft rejection in Turkish patients with renal transplants from living related donors. *Transplant. Proc.* 44(6), 1670–1678 (2012).
- 67 Morgun A, Shulzhenko N, Rampim GF *et al*. Interleukin-2 gene polymorphism is associated with renal but not cardiac transplant outcome. *Transplant. Proc.* 35(4), 1344–1345 (2003).

- 68 George S, Turner D, Reynard M *et al.* Significance of cytokine gene polymorphism in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 33(1–2), 483–484 (2001).
- 69 Hoffmann S, Park J, Jacobson LM *et al.* Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 66(4), 1686–1693 (2004).
- 70 Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol. Cell. Biochem.* 311(1–2), 57–65 (2008).
- 71 Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B *et al.* Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl. Int.* 21(9), 879–891 (2008).
- 72 Oetting WS, Schladt DP, Leduc RE *et al.* Validation of single nucleotide polymorphisms associated with acute rejection in kidney transplant recipients using a large multi-center cohort. *Transpl. Int.* 24(12), 1231–1238 (2011).
- 73 Karimi MH, Daneshmandi S, Pourfathollah AA *et al.* A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients. *Mol. Biol. Rep.* 39(1), 509–515 (2012).
- 74 Chen Z, Bouamar R, Van Schaik RHN *et al.* Genetic polymorphisms in *IL-2*, *IL-10*, *TGF-β1*, and *IL-2RB* and acute rejection in renal transplant patients. *Clin. Transplant.* 28(6), 649–655 (2014).
- 75 Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME *et al.* Cytokines and chronic rejection: a study in kidney transplant long-term survivors. *Transplantation.* 77(4), 548–552 (2004).
- 76 Pawlik A, Domanski L, Rozanski J *et al.* IL-2 and TNF-α promoter polymorphisms in patients with acute kidney graft rejection. *Transplant. Proc.* 37(5), 2041–2043 (2005).
- 77 Pawlik A, Domanski L, Rozanski J *et al.* The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival. *Ann. Transplant.* 13(2), 54–58 (2008).
- 78 Lobashevsky AL, Manwaring JE, Travis MM *et al.* Effect of desensitization in solid organ transplant recipients depends on some cytokines genes polymorphism. *Transpl. Immunol.* 21(3), 169–178 (2009).
- 79 Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant. Proc.* 35(Suppl. 3), S7–S14 (2003).
- 80 Huber S, Bruns CJ, Schmid G *et al.* Inhibition of the mammalian target of rapamycin impedes lymphangiogenesis. *Kidney Int.* 71(8), 771–777 (2007).
- 81 Slattery ML, Lundgreen A, Mullany LE, Penney RB, Wolff RK. Influence of CHIEF pathway genes on gene expression: a pathway approach to functionality. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 5(2), 100–111 (2014).
- 82 Slattery ML, Herrick JS, Lundgreen A, Fitzpatrick FA, Curtin K, Wolff RK. Genetic variation in a metabolic signaling pathway and colon and rectal cancer risk: mTOR, PTEN, STK11, RPKAA1, PRKAG2, TSC1, TSC2, PI3K and Akt1. *Carcinogenesis* 31(9), 1604–1611 (2010).
- 83 Zhu M-L, Yu H, Shi T-Y *et al.* Polymorphisms in *mTORC1* genes modulate risk of esophageal squamous cell carcinoma in eastern Chinese populations. *J. Thorac. Oncol.* 8(6), 788–795 (2013).
- 84 He J, Wang M-Y, Qiu L-X *et al.* Genetic variations of *mTORC1* genes and risk of gastric cancer in an eastern Chinese population. *Mol. Carcinog.* 52(Suppl. 1), e70–e79 (2013).
- 85 Ter-Minassian M, Wang Z, Asomaning K *et al.* Genetic associations with sporadic neuroendocrine tumor risk. *Carcinogenesis* 32(8), 1216–1222 (2011).
- 86 Cao Q, Ju X, Li P *et al.* A functional variant in the mTOR promoter modulates its expression and is associated with renal cell cancer risk. *PLoS ONE* 7(11), e50302 (2012).
- 87 Slattery ML, John EM, Torres-Mejia G *et al.* Genetic variation in genes involved in hormones, inflammation and energetic factors and breast cancer risk in an admixed population. *Carcinogenesis* 33(8), 1512–1521 (2012).
- 88 Shao J, Li Y, Zhao P *et al.* Association of *mTOR* polymorphisms with cancer risk and clinical outcomes: a meta-analysis. *PLoS ONE* 9(5), e97085 (2014).
- 89 Yang P-W, Hsieh M-S, Huang Y-C, Hsieh C-Y, Chiang T-H, Lee J-M. Genetic variants of EGF and VEGF predict prognosis of patients with advanced esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 9(6), e100326 (2014).
- 90 Li Q, Gu C, Zhu Y *et al.* Polymorphisms in the *mTOR* gene and risk of sporadic prostate cancer in an Eastern Chinese population. *PLoS ONE* 8(8), e71968 (2013).
- 91 Huang L, Huang J, Wu P *et al.* Association of genetic variations in *mTOR* with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Leuk. Lymphoma* 53(5), 947–951 (2012).
- 92 Han S, Chen P, Fan Q *et al.* Association of variants in *FRAP1* and *PDGFRA* with corneal curvature in Asian populations from Singapore. *Hum. Mol. Genet.* 20(18), 3693–3698 (2011).
- 93 Sun C, Southard C, Di Rienzo A. Characterization of a novel splicing variant in the *RAPTOR* gene. *Mutat. Res.* 662(1–2), 88–92 (2009).
- 94 Chen M, Cassidy A, Gu J *et al.* Genetic variations in PI3K–AKT–mTOR pathway and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* 30(12), 2047–2052 (2009).
- 95 Chen M, Gu J, Delclos GL *et al.* Genetic variations of the PI3K–AKT–mTOR pathway and clinical outcome in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *Carcinogenesis* 31(8), 1387–1391 (2010).
- 96 Allen EK, Manichaikul A, Chen W-M, Rich SS, Daly KA, Sale MM. Evaluation of replication of variants associated with genetic risk of otitis media. *PLoS ONE* 9(8), e104212 (2014).
- 97 Rye MS, Warrington NM, Scaman ESH *et al.* Genome-wide association study to identify the genetic determinants of otitis media susceptibility in childhood. *PLoS ONE* 7(10), e48215 (2012).
- 98 Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM *et al.* GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11(4), 895–904 (2003).
- 99 SNPinfo. <http://snpinfo.niehs.nih.gov>





- 100 Slattery ML, Lundgreen A, Herrick JS, Wolff RK. Genetic variation in *RPS6KA1*, *RPS6KA2*, *RPS6KB1*, *RPS6KB2*, and *PDK1* and risk of colon or rectal cancer. *Mutat. Res.* 706(1–2), 13–20 (2011).
- 101 Woillard J-B, Kamar N, Rousseau A, Rostaing L, Marquet P, Picard N. Association of sirolimus adverse effects with m-TOR, p70S6K or Raptor polymorphisms in kidney transplant recipients. *Pharmacogenet. Genomics* 22(10), 725–732 (2012).
- 102 Mas S, Gassó P, Ritter MA, Malagelada C, Bernardo M, Lafuente A. Pharmacogenetic predictor of extrapyramidal symptoms induced by antipsychotics: multilocus interaction in the mTOR pathway. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25(1), 51–59 (2015).
- 103 Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47(2–3), 85–118 (2000).
- 104 Gensburger O, Van Schaik RHN, Picard N *et al.* Polymorphisms in type I and II inosine monophosphate dehydrogenase genes and association with clinical outcome in patients on mycophenolate mofetil. *Pharmacogenet. Genomics* 20(9), 537–543 (2010).
- 105 Wu T-Y, Peng Y, Pellemounter LL *et al.* Pharmacogenetics of the mycophenolic acid targets inosine monophosphate dehydrogenases IMPDH1 and IMPDH2: gene sequence variation and functional genomics. *Br. J. Pharmacol.* 161(7), 1584–1598 (2010).
- 106 Mohamed MF, Frye RF, Langae TY. Interpopulation variation frequency of human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type II (*IMPDH2*) genetic polymorphisms. *Genet. Test.* 12(4), 513–516 (2008).
- 107 Garat A, Cauffiez C, Hamdan-Khalil R *et al.* IMPDH2 genetic polymorphism: a promoter single-nucleotide polymorphism disrupts a cyclic adenosine monophosphate responsive element. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 13(6), 841–847 (2009).
- 108 Wang J, Zeevi A, Webber S *et al.* A novel variant L263F in human inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 is associated with diminished enzyme activity. *Pharmacogenet. Genomics* 17(4), 283–290 (2007).
- 109 Roberts RL, Gearry RB, Barclay ML, Kennedy MA. *IMPDH1* promoter mutations in a patient exhibiting azathioprine resistance. *Pharmacogenomics J.* 7(5), 312–317 (2007).
- 110 Matimba A, Li F, Livshits A *et al.* Thiopurine pharmacogenomics: association of SNPs with clinical response and functional validation of candidate genes. *Pharmacogenomics* 15(4), 433–447 (2014).
- 111 Sombogaard E, van Schaik RHN, Mathot RA *et al.* Interpatient variability in IMPDH activity in MMF-treated renal transplant patients is correlated with IMPDH type II 3757T > C polymorphism. *Pharmacogenet. Genomics* 19(8), 626–634 (2009).
- 112 Winnicki W, Weigel G, Sunder-Plassmann G *et al.* An inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 single-nucleotide polymorphism impairs the effect of mycophenolic acid. *Pharmacogenomics J.* 10(1), 70–76 (2010).
- 113 Ohmann EL, Burckart GJ, Brooks MM *et al.* Genetic polymorphisms influence mycophenolate mofetil-related adverse events in pediatric heart transplant patients. *J. Heart Lung Transplant.* 29(5), 509–516 (2010).
- 114 Pazik J, Oldak M, Podgórska M *et al.* Lymphocyte counts in kidney allograft recipients are associated with *IMPDH2* 3757T>C gene polymorphism. *Transplant. Proc.* 43(8), 2943–2945 (2011).
- 115 Wang J, Yang JW, Zeevi A *et al.* IMPDH1 gene polymorphisms and association with acute rejection in renal transplant patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83(5), 711–717 (2008).
- 116 Shah S, Harwood SM, Döhler B, Opelz G, Yaqoob MM. Inosine monophosphate dehydrogenase polymorphisms and renal allograft outcome. *Transplantation* 94(5), 486–491 (2012).
- 117 Kagaya H, Miura M, Saito M, Habuchi T, Satoh S. Correlation of IMPDH1 gene polymorphisms with subclinical acute rejection and mycophenolic acid exposure parameters on day 28 after renal transplantation. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 107(2), 631–636 (2010).
- 118 Ohmann EL, Burckart GJ, Chen Y *et al.* Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 1 haplotypes and association with mycophenolate mofetil gastrointestinal intolerance in pediatric heart transplant patients. *Pediatr. Transplant.* 14(7), 891–895 (2010).
- 119 Kuehl P, Zhang J, Lin Y *et al.* Sequence diversity in *CYP3A* promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic *CYP3A5* expression. *Nat. Genet.* 27(4), 383–391 (2001).
- 120 Thervet E, Lloriot MA, Barbier S *et al.* Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87(6), 721–726 (2010).
- 121 Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for *CYP3A5* genotype and tacrolimus dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.* 98(1), 19–24 (2015).
- 122 Kim YG, Ihm C-G, Lee TW *et al.* Association of genetic polymorphisms of interleukins with new-onset diabetes after transplantation in renal transplantation. *Transplantation* 93(9), 900–907 (2012).
- 123 Kang ES, Kim MS, Kim YS *et al.* A variant of the transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene and the risk of posttransplantation diabetes mellitus in renal allograft recipients. *Diabetes Care* 31(1), 63–68 (2008).
- 124 Ghisdal L, Baron C, Le Meur Y *et al.* *TCF7L2* polymorphism associates with new-onset diabetes after transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 20(11), 2459–2467 (2009).
- 125 Kurawski M, Dzięwanowski K, Kedzierska K, Wajda A, Lapczuk J, Drozdziak M. Association of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene polymorphism with posttransplant diabetes mellitus in kidney transplant patients medicated with tacrolimus. *Pharmacol. Rep. PR* 63(3), 826–833 (2011).
- 126 McCaughan JA, McKnight AJ, Maxwell AP. Genetics of new-onset diabetes after transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 25(5), 1037–1049 (2014).
- 127 Yang J, Hutchinson II, Shah T, Min DI. Genetic and clinical risk factors of new-onset diabetes after

- transplantation in Hispanic kidney transplant recipients. *Transplantation* 91(10), 1114–1119 (2011).
- 128 Kurzawski M, Dziewanowski K, Łapczuk J, Wajda A, Drozdziak M. Analysis of common Type 2 diabetes mellitus genetic risk factors in new-onset diabetes after transplantation in kidney transplant patients medicated with tacrolimus. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68(12), 1587–1594 (2012).
  - 129 Ling Q, Xie H, Lu D *et al.* Association between donor and recipient *TCF7L2* gene polymorphisms and the risk of new-onset diabetes mellitus after liver transplantation in a Han Chinese population. *J. Hepatol.* 58(2), 271–277 (2013).
  - 130 Tong Y, Lin Y, Zhang Y *et al.* Association between *TCF7L2* gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med. Genet.* 10, 15 (2009).
  - 131 Zhang C, Bao W, Rong Y *et al.* Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Hum. Reprod. Update* 19(4), 376–390 (2013).



## B. Application en transplantation rénale : étude « POLYCIS »

Une étude « gènes candidats » de la voie de la calcineurine a été réalisée en parallèle de ces travaux bibliographiques.

POLYCIS était une étude pharmacogénétique rétrospective pilotée par le service de Pharmacologie, Toxicologie et de Pharmacovigilance du CHU de Limoges. Les patients inclus (N=381) étaient adultes, greffés rénaux *de novo*, traités par ciclosporine ou tacrolimus, et provenaient de différentes études cliniques menées dans le service de néphrologie des CHU de Limoges, Bordeaux et Toulouse : les essais cliniques APOMYGRE et OPERA, et la cohorte EPIGREN sont décrits dans l'article ci-après. Les données ont été collectées durant une année après la transplantation. L'objectif principal était de rechercher les variants génétiques de la voie de la calcineurine associés au risque de rejet aigu ou d'infections graves, deux phénotypes choisis comme marqueurs cliniques d'une sur ou d'une sous immunosuppression.

Dans cette étude, un deuxième panel de variants a été sélectionné après un travail d'exploration des séquences promotrices de certains gènes de la voie (les isoformes de la calcineurine et les immunophilines). L'objectif de ce travail complémentaire était de fiabiliser les informations de la base dbSNP du NCBI. En effet, les informations disponibles au niveau de ce type de pharmacogènes peu explorés sont parfois erronées. Cela a permis de connaître la fréquence allélique, non établie jusqu'alors, de certains variants et d'identifier un variant décrit à tort dans la base (SNP *PPP3R*- rs184336391) qui correspondait à un artefact analytique. Ce travail exploratoire a été présenté en poster au 13<sup>ème</sup> congrès de l'Association Internationale de Suivi Thérapeutique Pharmacologique et de Toxicologie Clinique (IATDMCT) (Salt Lake City, 2013) (44).





## A candidate gene approach of the calcineurin pathway to identify variants associated with clinical outcomes in renal transplantation

**Aim:** To investigate the potential influence of variants in genes involved in the calcineurin pathway on the efficacy and toxicity of calcineurin inhibitors in renal transplantation. **Materials & methods:** Twenty-three polymorphisms in thirteen genes were tested in 381 renal transplant recipients receiving ciclosporin ( $n=221$ ) or tacrolimus ( $n=160$ ) and mycophenolate mofetil. Data were collected prospectively over the first year post-transplantation. **Results:** Multivariate survival analyses revealed no genetic associations with biopsy proven acute graft rejection and serious infections. Donor-recipient Cytomegalovirus mismatch was the only variable associated with serious infection. **Conclusion:** This large exploratory study casts doubts on the potential interest of genetic biomarkers related to CNI pharmacodynamics but associations with other phenotypes in transplantation deserve further studies.

First draft submitted: 28 October 2015; Accepted for publication: 7 December 2015; Published online: 19 February 2016

**Keywords:** acute rejection • calcineurin • ciclosporin • genetic polymorphism • kidney transplantation • opportunistic infections • pharmacogenetics • tacrolimus

The serine/threonine phosphatase calcineurin and its downstream pathway are involved in several key biological systems including apoptosis, cardiac hypertrophy and lymphocyte activation [1]. The calcineurin inhibitors (CNI) ciclosporin A and tacrolimus bind to immunophilins (cyclophilin A and FKBP12, respectively). These complexes block the association of the calcineurin A catalytic subunit (CnA), calcineurin B regulatory subunit (CnB), calmodulin and calcium, preventing the dephosphorylation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) and thus its migration into the nucleus. The transcription of IL-2 and CD25, the IL-2 receptor  $\alpha$  chain are inhibited, decreasing T-cell activation and resulting in an immunosuppressive effect [2].

Lymphocyte proliferation and the expression of surface markers and intracellular cytokines have been proposed as pharmacodynamic biomarkers of CNI ther-

apy but are far from wide spread clinical implementation [3]. Noceti *et al.* showed that NFAT1 in the nucleus, IL-2 in the cytoplasm and CD25 expression on the surface of T cells exhibited greater interindividual variability in stimulated peripheral blood mononuclear cells exposed to tacrolimus compared with control conditions [4]. Polymorphisms in genes coding for the different proteins of the pathway may result in variable cellular responses to CNI and potentially explain the variability observed. Pharmacogenetics of CNI has primarily focused on drug metabolizing enzymes and membrane transporters [5]. While therapeutic drug monitoring largely accounts for genetic variation in drug disposition, variants influencing pharmacodynamics may further contribute to better tailor therapy.

Of the genes in the calcineurin response pathway, we considered those coding for the main proteins involved and selected variants

Lucie Pouch, Matthias Koitka, Jana Stojanova, Jean-Baptiste Woillard, Caroline Monchaud, Claire Villeneuve, Marie Essig, Julie Abraham, Yannick Le Meur, Jean-Philippe Rerolle, Nassim Kamar, Lionel Rostaing, Pierre Merville, Peggy Gandia, Stephane Bouchet, Britt-Sabina Petersen, Pierre Marquet & Nicolas Picard\*

\*Author for correspondence:

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France. Tel.: +33 555 056 140 Fax: +33 555 056 162 [nicolas.picard@unilim.fr](mailto:nicolas.picard@unilim.fr)

For full author affiliations list, please see page 390

Future  
Medicine part of fsg

with published reports of possible functional effects (see Table 1 for references). Associations between variants of genes related to the calcineurin pathway and immune diseases have been previously reported. Specifically, comprehensive work involving *IL2* and *IL2RA* genes has been conducted for autoimmune diseases such as multiple sclerosis, inflammatory bowel disease and Type 1 diabetes. Clinical outcomes in solid organ transplantation have been less explored but there is an emerging body of work. Moscoso *et al.* studied two SNPs (rs8177826 and rs6850) in the *PPIA* (cyclophilin A) promoter and found that the rs8177826 is associated with increased risk of nephrotoxicity (odds ratio [OR]: 3.49; 95% CI: 1.47–8.24;  $p = 0.006$ ) [6]. *IL2* rs2069763 and rs2069762 located in 5' upstream and in exonic (synonymous) regions respectively have been the subject of several investigations in solid organ transplantation. The former associated with acute rejection (clinical or biopsies finding) [7]. Morgun *et al.* found a higher frequency of rs2069762 TT genotype in renal transplant patients experiencing at least one biopsy proven acute rejection (BPAR) episode [8].

The aim of the present study was to test strategically selected variants in genes of the calcineurin pathway and investigate, in a population of renal transplant recipients, their influence on two major transplantation phenotypes: acute graft rejection and serious infections, within the first post-transplant year.

## Materials & methods

### Patients & data

Three hundred and eighty one adult *de novo* renal transplant patients, predominantly of European descent, were included. They were selected from: two multicenter randomized clinical trials, APO-MYGRE (NCT0019967;  $n = 121$ ) [12] and OPERA (NCT02005562;  $n = 21$ ) [13] and a prospective cohort of renal transplant recipients promoted by Limoges University Hospital (Limoges, France; EPIGREN;  $n = 233$  enrolled). All three studies were performed respecting the Helsinki Declaration, approved by ethics committees of the involved institutions and authorized by the French Agency for Medicines and Health Products Safety. Patients were included in the present study after providing specific written informed consent for pharmacogenetic analyses. Data were collected prospectively over the first 12 months post-transplantation in all three studies.

### Treatment

Demographic data are presented in Table 2. Patients received ciclosporin ( $n = 221$ ) or tacrolimus ( $n = 160$ ) and mycophenolate mofetil as initial immunosuppressive regimen. Switch from one CNI to another

or to mTOR inhibitors was possible in the EPIGREN cohort (Table 2). Cytomegalovirus (CMV) treatment or prophylaxis, *Pneumocystis jiroveci* prophylaxis and steroid tapering protocols differed between studies, and are described in Table 2.

### Clinical outcomes

The clinical outcomes considered were BPAR episodes, representing underimmunosuppression, and serious infections, representing overimmunosuppression. Adverse events collected in all three studies were analyzed by the same pharmacovigilance unit and coded using the standardized MedDRA dictionary [14]. Information concerning BPAR was obtained from protocol and routine biopsies. Serious infections corresponded to adverse events ('infections and infestations' System Organ Class category) and characterized by severity (i.e., lethal, life-threatening, requiring hospitalization or resulting in a persistent or significant disability or incapacity, or in a congenital anomaly or in a birth defect). In the specific case of diarrhea (frequently observed during mycophenolate mofetil or tacrolimus treatment), only reports with a febrile syndrome were considered. Cumulative data concerning the outcomes studied are presented in Table 3.

### Selection of candidate gene polymorphisms

Thirteen genes coding the proteins expressed in T cells were studied: cyclophilin A (*PPIA*), FKBP12 (*FKBP1A*), calmodulin 1–3 isoforms (*CALM1*, 2, 3), calcineurin A ( $\alpha$  and  $\beta$  subunits; *PPP3CA*, *PPP3CB*) and B ( $\alpha$  subunit; *PPP3RI*), NFAT1, 2 and 4 (*NFATC1*, 2, 3), IL-2 (*IL2*) and the IL-2  $\alpha$ -chain receptor (*IL2RA*).

The selected candidate gene polymorphisms were: variants in exons reported in the National Center for Biotechnology Information SNP database (dbSNP; as of August 2014) with a minor allelic frequency (MAF  $\geq 10\%$ ) in Caucasians; additional variants reported in the literature with a convincing functional effect (i.e., variant with clinical associations in two independent populations, or in a single population with additional *in vitro* or *in silico* evidence); and novel variants (MAF  $\geq 10\%$ ) identified in the promoter regions through sequencing (Table 1).

### Sequencing work

To confirm frequent variants reported in National Center for Biotechnology Information dbSNP, we sequenced the promoter regions of five key genes in 75 healthy Caucasian volunteers: *PPIA* (652 bp), *FKBP1A* (636 bp), *PPP3CA* (948 bp), *PPP3CB* (687 bp) and *PPP3RI* (787 bp). Primers were designed using Primer3plus [15] and obtained from Eurofins Genomics





Table 1. List of SNPs selected for their convincing functional effects according to the selection criteria.

Gene symbol	Protein	dbSNP reference	Genomic position	HGVS name <sup>†</sup>	Criteria for selection (see methods) <sup>‡</sup>	Reported MAF	Ref.
PPIA	Cyclophilin A	rs8177826	Promoter	c.-56C>G	Sanger direct resequencing	G = 0.033 <sup>§</sup>	[6,9–11]
		rs6850	5'-UTR	c.-10A>G		G = 0.384 <sup>§</sup>	[10]
PPP3CA	Calcineurin A, subunit alpha	rs45441997	5'-UTR	c.-85_-83ins GGC	Sanger direct resequencing	GGC = 0.268 <sup>¶</sup>	[7,8,12–16]
PPP3R1	Calcineurin B, subunit alpha	rs4519508	5'-UTR	c.-317C>T	Sanger direct resequencing	T = 0.308 <sup>§</sup>	[17,18]
		rs4347819	Promoter	c.-412T>C	Sanger direct resequencing	T = 0.433 <sup>¶</sup>	
		rs3039851	Intron1	c.41055_41051delATTAA	Sanger direct resequencing	No ref	
		rs72174030	Promoter	c.460_459insGCCGGCCCCGCCGCG		No ref	
		rs1868402	Intron4	c.466–895C>T	Clinical and functional study	G = 0.301 <sup>§</sup>	
CALM1	Calmodulin 1	rs12885713	5'-UTR	c.-218C>T	Missense mutation ([Cys] ⇒ [Gly]) in exonic region	T = 0.400 <sup>¶</sup>	[20–22]
NFATC1	NFAT	rs754093	Exon11	c.2251T>G		G = 0.451 <sup>§</sup>	
IL2	IL-2	rs2069762	5'-UTR	c.-385T>G	Clinical association + replication	G = 0.232 <sup>§</sup>	[8,23–25]
		rs2069763	Exon1	c.114G>T		A = 0.40 <sup>#</sup>	
IL2RA	IL-2 alpha receptor	rs6822844	Upstream	g.123509421G>T	Clinical association + replication	T = 0.146 <sup>§</sup>	[24,26–28]
		rs11938795	Downstream	g.123073009T>C		C = 0.217 <sup>§</sup>	
		rs2104286	Intron1	c.64+5006A>G	Clinical association + replication	C = 0.252 <sup>§</sup>	[34,35,36]
		rs4147359	Upstream	g.6108439G>A		A = 0.336 <sup>§</sup>	
		rs7090530	Upstream	g.6110875C>A		C = 0.393 <sup>§</sup>	
		rs41295061	Upstream	g.6114660C>A		A = 0.050 <sup>§</sup>	
IL2RB	IL-2 beta receptor	rs11594656	Upstream	g.6122009T>A	Clinical association + replication	A = 0.265 <sup>§</sup>	[40–42]
							[41]

<sup>†</sup>For variant located in the gene, position in the transcript, reference is given (NM accession number); for variant located out of the gene, position in the genome reference (NG accession number) is given.

<sup>‡</sup>References for the clinical associations are not exhaustive.

<sup>§</sup>Hapmap data.

<sup>¶</sup>Other Caucasian population referenced in dbSNP.

<sup>#</sup>1000 genomes data.

<sup>¶</sup>Human Genome Variation Society: MAF: Minor allelic frequency; NFAT: Nuclear factor of activated T cell



Table 1. List of SNPs selected for their convincing functional effects according to the selection criteria (cont.).							
Gene symbol	Protein	dbSNP reference	Genomic position	HGVS name <sup>a</sup>	Criteria for selection (see methods) <sup>b</sup>	Reported MAF	Ref.
IL2RA (cont.)	IL-2 alpha receptor	rs706778	Intron1	c.64+5102G>A		T = 0.403 <sup>s</sup>	[43,44]
		rs3118470	Intron1	c.64+2338A>G		C = 0.310 <sup>s</sup>	[43,45,46]
		rs12722489	Intron1	c.64+2039G>A		T = 0.173 <sup>s</sup>	[34,35]
		rs12722605	3'-UTR	c.*1672A>T		A = 0.143 <sup>s</sup>	[47,48]
For variant located in the gene, position in the Transcript reference is given (NM accession number); for variant located out of the gene, position in the genome reference (NG accession number) is given.							
<sup>a</sup> References for the clinical associations are not exhaustive.							
<sup>b</sup> Hapmap data.							
<sup>c</sup> Other Caucasian population referenced in dbSNP.							
<sup>d</sup> 1000 genomes data.							
HGVS: Human Genome Variation Society; MAF: Minor allelic frequency; NFAT: Nuclear factor of activated T cell.							

(Courtaboeuf, France). Briefly, PCR products were digested by Exonuclease I (ExoI) and Fast Alkaline Phosphatase and the sequencing reaction was done using the BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Courtaboeuf, France). Sequences were purified using sephadex and read on a 3730xl DNA Analyzer (Life Technologies). Purification and sequencing were performed by the Institute of Clinical Molecular Biology, University of Kiel, Germany. Screening of variants was performed using Sequencher® software (Gene Codes Corporation, MI, USA). Details of the sequencing work and allelic frequencies of variants are presented in Supplementary Table 1.

Genotyping

Genomic DNA was isolated and purified from EDTA-treated whole blood using the QIAamp® DNA blood minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France) or from saliva collected with the ORAGENE® OG-500 DNA collection kit (DNA Genotek inc., Ottawa, Canada) following the manufacturer precipitation protocol. The list of variants genotyped is presented in Table 1. Taqman® real-time PCR discrimination assays (Life Technologies) were performed using 10 ng of DNA and the Type-it Fast SNP Probe PCR Kit (Qiagen) using the ABI 7500 real-time PCR system (Life Technologies) or Rotorgene Q instrument (Qiagen). Sanger sequencing was performed to for IL2 rs2069763 and CALM1 rs754093. The different genotyping methods and PCR protocols for sequencing are described in Supplementary Table 1.

Statistical analysis

Given the exploratory nature of the present study, an *a priori* power calculation was not performed. Statistical analyses were performed using R software version 3.1.1 (R foundation for statistical computing, [49]). Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were assessed using the Fisher exact test with the package ‘SNPassoc.’ Cox analyses were performed using the package ‘Survival.’ In order to study subsequent events in the same patients, BPARs or serious infections were studied as cumulative variables in survival analyses. Two serious infections with similar descriptions were considered independent if the dates of onset had been reported with an interval of at least 7 days. Covariates known to be associated with acute kidney graft rejection were included in the analysis [50–52]: HLA mismatch score (including HLA-A, HLA-B and HLA-DR), age and sex of the recipient, CMV infections, donor/recipient CMV status combination serology and immunosuppressant (IS) blood levels. Similarly, covariates

Table 2. Demographic data of patients according their original studies.				
Study	OPERA	APOMYGRE	EPIGREN	
			Bordeaux	Limoges
Nature	Clinical trial	Clinical trial	Cohort study	
Study duration	May 2006–July 2008	September 2003–October 2004	July 2007–October 2011	
Post-transplantation follow-up time points	D7, D14, M1, M3, M6, M12	D14, M1, M3, M6, M12	M1, M2, M3, M6, M9, M12	
Patients (n) included in POLYCIS	27	121	233	68
			117	48
Type of ICN	Ciclosporin	Ciclosporin	Ciclosporin (n = 73), tacrolimus (n = 160)	
Patients taken mTor drugs at least once during the follow-up, n (%)	0	0	2	7
Induction therapy	Basiliximab	Basiliximab (20 mg on days 0 and 4)	Basiliximab	Basiliximab
Steroid tapering protocol	500 mg of iv. methylprednisolone then prednisolone orally initiated at 0.5 mg/kg/day then reduced on days 1–7, discontinuation at day 7	Methylprednisolone iv. 500 mg, then prednisolone orally at 1 mg/kg/day on days 1–7, 0.5 mg/kg/day on days 8–14 then reduced weekly by 5 mg/day to a 20 mg total dose, 2.5 mg/day to a 10 mg total dose until discontinued if possible [12]	Methylprednisolone iv. 500 mg then nonimmunized patients: prednisolone orally 120 (J1) then 20 mg reduced until J7/J10 then discontinuation-immunized patients: prednisolone orally 120 (J1–J4) then 20 mg/day reduced until J7/J10 then 5 mg/day	Methylprednisolone iv. 500 mg, then prednisolone orally reduced until 20 mg/day at M1 then 10 at M2 then 5 at M3 (lifelong)
Immunosuppressive regimen	FD of ciclosporin for 3 days post-transplant then CC on C2 level	Dose adjustment on C2 level of ciclosporin from the first day post-transplant	Dose adjustment on C0/C2 level of ciclosporin/C0 level of tacrolimus. Switch between CNI or to mTOR inhibitor possible	Dose adjustment on C0/C2 level of ciclosporin/C0 level of tacrolimus, Switch between CNI or to mTOR inhibitor possible

Continuous variables are expressed as mean (SD) and categorical ones as n (%).  
AUC: Area under the concentration curve; C: Concentration; CC: Concentration controlled; CMV: Cytomegalovirus; CNI: Calcineurin inhibitor; D+: Positive donor; D-: Negative donor; FD: Fixed dose; iv.: Intravenous; M: Month; MMF: Mycophenolate mofetil; R+: Positive recipient; R-: Negative recipient; SD: Standard deviation.

Table 2. Demographic data of patients according their original studies (cont.).

Study	APOMYGRE			EPIGREN		
	OPERA	Bordeaux	Limoges	Toulouse		
Immunosuppressive regimen (cont.)	1 g twice daily of MMF in a FD group, dose adjustment of MPA AUC in a CC group	MMF: dose adjustment on MPA AUC	MMF: dose adjustment on MPA AUC	MMF: dose adjustment on MPA AUC		
Prevention of CMV infection	CMV prophylaxis (ganciclovir) for D+/R- in a CC group	Before 2010: monitoring by PCR for all patients (pre-emptive strategy)	CMV prophylaxis for D+/R- and D-/R-	6 months CMV prophylaxis for D+/R and 3 months prophylaxis for R+		
	According the center for other prophylaxis	According the center for other prophylaxis	Monitoring by PCR for other	Monitoring by PCR for other		
Prevention of pneumocystis jirovecii	Trimethoprim/ sulfamethoxazole (all patients)	Trimethoprim/ sulfamethoxazole (all patients)	Trimethoprim/ sulfamethoxazole (all patients)	Trimethoprim/ sulfamethoxazole (all patients)		
Recipient age (years), mean (Sd)	53 (9.4)	50.3 (13.4)	53.4 (12.6)	52.3 (12.5)	49.9 (12.4)	
Male/female (%)	61/39	65/35	66.7/33.3	70.4/29.6	60.9/39.1	
Patients with corticoid at the end of the follow-up, n (%)	0	0	11 (9.4)	11 (16.2)	1 (2.0)	
HLA mismatches, (score/6), mean (SD)	3.7 (0.9)	3.8 (1.1)	4.2 (1.3)	4.3 (1.2)	4.4 (1.3)	
Serology combination D/R status, n (%)	D+/R+: 75 (26.1); D+/R-: 65 (22.7); D-/R+: 75 (26.1); D-/R-: 72 (25.9)					

Continuous variables are expressed as mean (SD) and categorical ones as n (%).  
AUC: Area under the concentration curve; C: Concentration; CC: Concentration controlled; CMV: Cytomegalovirus; CNI: Calcineurin inhibitor; D+: Positive donor; D-: Negative donor; FD: Fixed dose; iv: Intravenous; M: Month; MMF: Mycophenolate mofetil; R+: Positive recipient; R-: Negative recipient; SD: Standard deviation.





Table 3. Descriptive data about the cumulative outcomes.

Cumulative events/ patient	Acute rejection	All serious infections	CMV serious infections
No event, n (%)	304 (79.8)	255 (66.9)	342 (89.8)
1/patient, n (%)	59 (15.5)	82 (21.5)	25 (6.6)
2/patient, n (%)	15 (3.9)	25 (6.6)	9 (2.4)
3/patient, n (%)	0	13 (3.4)	3 (0.8)
4/patient, n (%)	0	3 (0.8)	1 (0.3)
5/patient, n (%)	0	2 (0.5)	0
n = 381 patients; 2484 occurrences measured over the year post-transplantation (visits*n patients). CMV: Cytomegalovirus.			

potentially involved in the risk of serious infections were included: age and sex of the recipient, donor/recipient CMV status combination serology, acute rejection and IS blood exposure. As prophylaxis practices and IS regimen can differ between centers or study protocols, multivariate analyses were adjusted on these variates.

We collected all immunosuppressant blood concentrations available within the follow-up period. To take into account missing data and switches from one drug to another, we constructed a score compiling the data (i.e., ciclosporin trough and 2-h postdose concentrations [ $C_0$  and  $C_2$ ]; tacrolimus, sirolimus and everolimus  $C_0$  and mycophenolic acid area under the plasma concentration curve [AUC]). Data were split into three groups with the following percentile thresholds: 'low' (<25th percentile), 'normal' (25th–75th) and 'high' (>75th) exposure. Scores (from 1 to 3) were attributed to each patient for each visit, as the mean of available data, to obtain a longitudinal variable. Percentile values used to calculate the score are presented in Table 4.

The effect of variants as well as of covariates on the risk of acute graft rejection or serious infection was investigated using time-dependent Cox proportional hazards regression models, considering cumulated events in the first year post-transplantation. Initially, each covariate was tested in univariate analysis. Variables with p-value < 0.1 were included simultaneously in an intermediate multivariate model.

Each covariate was removed in turn to confirm its relevance using the likelihood ratio test (backward deletion strategy). Potential confounding effects related to the study group or the CNI employed were evaluated. Because the basal risks of infection and acute rejection differed according the nature of the CNI, univariate and multivariate analyses were thus stratified on this variable. Cox models were fitted on the stratum function; baseline function depends on each stratum. Results from the two strata were pooled to get an overall estimate of  $\beta$  coefficients. Bonferroni correction was applied to the risk estimates from the final models to account for multiple testing (27 variables tested in univariate analyses). A significance effect was observed when  $p < 0.05/27 = 0.002$ . The additive model was used for all genetic loci tested.

Proportionality of risk was checked for final models using Schoenfeld residues.

Codes used in R software are given in Supplementary Data.

## Results

### Study population

Demographic characteristics and drug regimens are described in Table 2. Eight patients were lost to follow-up (one at month 6, one at month 9 and six at month 12), one died at month 10 and one lost his/her graft at month 9 post-transplantation. These patients were thus censored at these endpoints. 89 BPAR and

Table 4. Percentile values of the immunosuppressant exposure concentrations.

Score exposure	Tacrolimus C0 ( $\mu\text{g/l}$ )	MPA AUC ( $\text{mg/l/h}$ )	Ciclosporin C0 ( $\mu\text{g/l}$ )	Ciclosporin C2 ( $\mu\text{g/l}$ )	Everolimus C0 ( $\mu\text{g/l}$ )	Sirolimus C0 ( $\mu\text{g/l}$ )
'Low'	<7.1	<25.8	<110.8	<780	<5	<4
'Normal'	9–11.2	34.7–45.1	141–184.3	1045–1359.8	8–10	7–10.3
'High'	>11.2	>45.1	>184.3	>1359.8	>10	>10.3
AUC: Area under the concentration curve; C0: Concentration trough; C2: 2-h postdose concentration of ciclosporin; MPA: Mycophenolic acid; Score exposure: 'low' corresponded to values <25th percentile, 'normal' between 25th and 75th percentile and 'high' to >75th percentile.						

193 serious infections episodes were reported for the 381 patients included within the period of follow-up (Table 3).

Bacterial, viral and fungal infections represented 42.0, 33.7 and 3.1% of all reported infections. The most frequent viral infection was due to CMV (23.8%) and bacterial was urinary (15.5%). Twenty percent of infections were not specified and reported as 'fever,' 'sepsis' and 'infections' (Supplementary Table 2).

#### Immunophilin & calcineurin promoter variants

Sequencing work revealed two frequent SNPs in the *PPIA* promoter (rs6850 and rs8177826) in our population of healthy volunteers. A rare variant 192bp upstream the initiation codon (rs149278688) and a 10 GCC repetition motif (rs45441997) in the promoter of *PPP3CA* were detected. MAFs found in our population were similar to those reported in dbSNP, except for *PPIA* variants which showed markedly higher (rs6850) or lower MAF (rs8177826) than reported (see Supplementary Table 3). A frequent 29 bp insertion (rs72174030; frequency = 0.56) was found in *PPP3R1* promoter although no frequency has been reported in dbSNP [53]. No variants were found in the *PPP3CB* or *FKBP1A* promoters.

#### SNPs selection

Among the 13 genes studied, 23 genetic polymorphisms were considered. Sixteen variants were selected through literature review, most of being in *IL2* (n = 4) and *IL2RA* (n = 9). One variant in *NEAT* (rs754093) is a nonsynonymous SNP. Six additional variants were found through the sequencing work: two SNPs, rs6850 and rs8177826, in *PPIA*; two SNPs, rs4347819 and rs4519508 and the 29bp insertion, rs72174030 in *PPP3R1*; the short tandem repetition rs45441997 in *PPP3CA*.

Allele distributions conformed to the Hardy-Weinberg equilibrium except for *CALMI* rs12885713 which was excluded from further analyses.

#### Genetic & nongenetic associations with the occurrence of acute renal rejection

No variants associated with acute kidney graft rejection (Table 5). Tacrolimus use associated with a lower acute rejection risk compared with ciclosporin (hazard ratio [HR] = 0.45 [0.24–0.86];  $p < 0.0001$ , univariate analysis). We found different risk between transplantation centers which were not significant following Bonferroni correction ( $p = 0.02$  for a corrected threshold of  $p = 0.002$ ). The risk was not influenced by the IS blood exposure score. No other clinical covariate was found to associate with acute rejection risk (Table 6).

#### Genetic & nongenetic associations with the occurrence of serious infection

We found a significant and strong association of the CMV D+/R- mismatch with an increased risk of serious infection. Of note, it did not remain significant when CMV infections were excluded from the analysis (data not shown). Increased recipient age was also a risk factor (Table 8). There was a tendency for a difference in infection incidence across centers, but was not significant following Bonferroni correction (Table 8).

*IL2* rs6822844 associated with serious infection in univariate analyses, but not in the multivariate model (Table 7). We tested associations with infection risk removing CMV infections, but the results were similarly negative (data not shown).

Serious infection was not influenced either by the CNI administered (tacrolimus or ciclosporin) or by the IS blood exposure score.

#### Discussion

We tested variants in 13 key genes of the calcineurin pathway for association with acute rejection and serious infection risk in CNI-treated renal transplant patients, but found no significant associations.

Few studies have investigated the variability of CNI target genes in relation to clinical outcomes in transplantation, primarily focusing on variants in *PPIA* and *IL2* [54]. This is the first report testing these and additional polymorphisms in other genes of the pathway simultaneously.

The variants selection was based on previous clinical associations and on expected functional effects. We did not perform a full genomic analysis of each gene of the pathway and it is possible that additional variants with functional effects were missed. The objective was primarily to identify one or several genes to be further studied more carefully.

Potential minor effect size may have been veiled by other clinical covariates with large significant effects. We indeed found that rs6922844-T associated with an increased risk of serious infection in univariate analysis, but not after adjustment. The D+/R- CMV mismatch was the most important risk factor of serious infection, probably due to the large proportion of this type of infection among all infections (46 events: 24% of all reported serious infections, Supplementary Table 2). It is possible that reporting of adverse events as well as biopsy interpretations differ between transplantation centers, a challenge to control in retrospective multicenteric studies. Nonetheless, pooling patients from three different studies permits achieving greater statistical power.

When studying cumulative incidence of serious infections or acute rejections depending on patient genotypes, we observed different effects depending



Table 5. Associations with the incidence of acute kidney graft rejection over the first year post-transplantation (multivariate Cox model results): genetic covariates.

Gene	Variant	Model	MAF	Acute graft rejection				Multivariate		
				n	HR	Univariate		HR	95% CI	p-value
						95% CI	p-value			
PPIA	rs8177826	G vs C	G = 0.095	365	1.29	0.7383–2.267	0.368			
	rs6850	G vs A	G = 0.172	287	0.58	0.2599–1.295	0.184			
PPP3CA	rs45441997	GCC [10/10] vs GCC [8/8]	GGC [10] = 0.311	66	1.12	0.5022–2.489	0.785			
PPP3R1	rs4519508	T vs C	T = 0.394	364	0.94	0.6109–1.454	0.788			
	rs4347819	T vs C	T = 0.342	344	1.05	0.6913–1.587	0.827			
	rs3039851	DEL vs INS	Del = 0.124	367	1.41	0.5805–3.399	0.451			
	rs72174030	DEL vs INS	Ins = 0.344	77	0.72	0.4141–1.219	0.215			
	rs1868402	G vs A	G = 0.292	228	1.10	0.6889–1.758	0.689			
NFACT1	rs754093	G vs T	G = 0.495	194	1.11	0.7314–1.679	0.628			
IL2	rs2069762	G vs T	G = 0.273	381	0.78	0.4956–1.215	0.267			
	rs2069763	T vs G	T = 0.358	193	0.83	0.4875–1.419	0.499			
	rs6822844	T vs G	T = 0.155	372	0.80	0.4457–1.428	0.447			
	rs11938795	C vs T	C = 0.305	380	1.08	0.703–1.651	0.732			
	rs2104286	C vs T	C = 0.226	372	1.06	0.6826–1.629	0.811			
IL2RA	rs4147359	A vs G	A = 0.31	371	0.81	0.5168–1.256	0.34			
	rs7090530	C vs A	C = 0.462	366	1.10	0.7882–1.517	0.592			
	rs41295061	A vs C	A = 0.09	368	0.90	0.4513–1.81	0.775			
	rs11594656	A vs T	A = 0.305	367	0.93	0.6105–1.415	0.733			
	rs706778	T vs C	T = 0.396	367	1.30	0.88–1.911	0.189			
	rs3118470	C vs T	C = 0.273	353	0.70	0.4544–1.082	0.109			
	rs12722489	T vs A	T = 0.138	367	0.58	0.2927–1.132	0.109			
	rs12722605	A vs T	A = 0.27	363	1.33	0.7714–2.302	0.303			

Study: The original study with O Opera, E for Epigen and A for Apomygre).  
DEL: Deletion; HR: Hazard ratio; INS: Insertion; MAF: Minor allelic frequency.



Table 6. Associations with the incidence of acute kidney graft rejection over the first year post-transplantation (multivariate Cox model results): clinical covariates.

Covariates	Model	n	Acute graft rejection					
			Univariate			Multivariate		
			HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Centers (ref : APOMYGRE)	EPIGREN Bordeaux	381	3.52	1.5700–7.905	0.00226	3.52	1.5700–7.905	0.00226*
	EPIGREN Toulouse		0.54	0.1287–2.261	0.39851			
	EPIGREN Limoges		1.09	0.4666–2.555	0.83959			
	OPERA		0.95	0.2726–3.303	0.93435			
HLA mismatches	Per unit	365	1.18	0.9204–1.523	0.189			
Age of recipient	Per year increase	381	0.99	0.972–1.013	0.481			
Sex of recipient	W vs M		0.57	0.2961–1.095	0.0912			
Serious CMV infection	Yes vs no	381	1.51	0.3545–6.406	0.579			
CMV combination D/R status	D+/R- vs other		1.69	0.9105–3.15	0.0962			
Immunosuppression score	Per unit increase	361	0.80	0.6309–1.014	0.0648			
*Not significant after Bonferroni correction (corrected threshold of p = 0.002). CMV: Cytomegalovirus; D: Donor; HR: Hazard ratio; M: Men; R: Recipient; W: Women.								

\*Not significant after Bonferroni correction (corrected threshold of  $p = 0.002$ ).  
CMV: Cytomegalovirus; D: Donor; HR: Hazard ratio; M: Men; R: Recipient; W: Women.

on the nature of the CNI administered. Tacrolimus use associated with a lower acute rejection risk compared with ciclosporin. This could not be explained by the study group. A larger study (ELITE symphony study,  $n = 1465$  patients) also associated less BPARs with low-dose tacrolimus when compared with both low-dose and standard-dose ciclosporin at 1 year post-transplantation [55]. We took into account this different basal risk by stratifying the survival analyses on the nature of CNI administered. Variants in immunosuppressant metabolizing enzymes (e.g., *CYP3A5*\*3, *CYP3A4*\*22) were voluntarily not studied here. Their influences on the incidence of acute rejections or infections remain controversial or have not been formally demonstrated [56]. Also, this omission was partially overcome by integrating immunosuppressant blood concentrations in the analyses.

We did not find an influence of IS blood levels on the two outcomes studied. In order to take into account potential switch or missing blood concentrations during patient follow-up, we collected all available concentration data within the year for all IS for which monitoring was performed and constructed a global immunosuppressive score based on percentile ranking over time. We acknowledge that such an approach has limitations (episodes of under- or overexposure and their consequences might be hidden by the clustering) but our objective was to take into account global drug exposure over the follow-up period when investigating the potential effect of genetic variants.

HLA antibodies sensitization is another well-known risk factor of acute rejection, which was not included in the present analysis. The inclusion of the patients spreads from 2006 to 2011 and important evolution of immunodetection techniques of HLA antibodies occurred over this time frame. Specifically newer assays allow the identification of donor-specific antibodies and a better discrimination of class I and II antibodies, the latter being stronger determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection [57]. It would have been particularly difficult to integrate this data in a relevant way here, but this deserves consideration as a limitation.

We recently reviewed the genetic associations reported for calcineurin pathway in different clinical settings and identified the most promising candidates to perform pharmacogenetic studies in solid organ transplantation [54] (accepted for publication). Among the highly recommended candidates identified through the literature review, we studied four: *PPP3CA* rs45441997, *PPP3R1* rs1868402, *CALM1* rs12885713 and *IL2* rs2069763. All had been tested in at least one well-designed clinical study, and their functional effects were supported by a clear mecha-

Table 7. Associations with the incidence of serious infection over the first year post-transplantation (multivariate Cox model results): genetic covariates.

Gene	Variant	Model	MAF	Serious infections			Multivariate		
				n	HR	95% CI	p-value	HR	95% CI p-value
PPIA	rs8177826	G vs C	G = 0.095	365	0.70	0.4471–1.097	0.119		
	rs6850	G vs A	G = 0.172	287	0.77	0.5112–1.161	0.213		
PPP3CA	rs45441997	GCC [10/10] vs GCC [8/8]	GCC [10] = 0.311	66	0.91	0.5084–1.632	0.753		
PPP3R1	rs4519508	T vs C	T = 0.394	364	0.85	0.6365–1.127	0.255		
	rs4347819	T vs C	T = 0.342	344	0.90	0.6793–1.198	0.478		
	rs3039851	DEL vs INS	Del = 0.124	367	0.91	0.6425–1.291	0.599		
	rs72174030	DEL vs INS	Ins = 0.344	77	0.70	0.4428–1.095	0.117		
	rs1868402	G vs A	G = 0.292	228	1.32	0.9655–1.793	0.0823		
NFATC1	rs754093	G vs T	G = 0.495	194	1.20	0.8162–1.77	0.352		
IL2	rs2069762	T vs G	G = 0.273	381	1.08	0.815–1.43	0.594		
	rs2069763	T vs G	T = 0.358	193	0.62	1.601–0.3798	0.0636		
	rs6822844	T vs G	T = 0.155	372	1.52	1.124–2.065	0.0066		
	rs11938795	C vs T	C = 0.305	380	0.86	0.665–1.1	0.224		
	rs2104286	C vs T	C = 0.226	372	1.21	0.8757–1.659	0.252		
IL2RA	rs4147359	A vs G	A = 0.31	371	0.90	0.6793–1.198	0.478		
	rs7090530	C vs A	C = 0.462	366	1.03	0.8064–1.311	0.822		
	rs41295061	A vs C	A = 0.09	368	1.34	0.8434–2.133	0.215		
	rs11594656	A vs T	A = 0.305	367	1.26	0.9529–1.67	0.105		
	rs706778	T vs C	T = 0.396	367	1.22	0.9375–1.595	0.138		
	rs3118470	C vs T	C = 0.273	353	0.82	0.6133–1.102	0.19		
	rs12722489	T vs A	T = 0.138	367	0.82	0.5568–1.199	0.302		
	rs12722605	A vs T	A = 0.27	363	1.18	0.8467–1.655	0.324		

DEL: Deletion; HR: Hazard ratio; INS: Insertion; MAF: Minor allelic frequency.



Table 8. Associations with the incidence of serious infection over the first year post-transplantation (multivariate Cox model results): clinical covariates.								
Covariates	Model	n	Serious infections			Multivariate		
			HR	95% CI	p-value	HR	95% CI	p-value
Centers (ref : APOMYGRE)	EPIGREN Bordeaux	381	2.04*	1.1351–3.673*	0.0172*	2.168*	1.165–4.035*	0.01465* <sup>†</sup>
	EPIGREN Toulouse		1.27	0.6576–2.456	0.4760			
	EPIGREN Limoges		2.48*	1.3411–4.593*	0.0038*	2.686*	1.433–5.036*	0.00206* <sup>†</sup>
	OPERA		0.74	0.3409–1.591	0.4365			
Age of recipient	Per year increase	381	1.02*	1.003–1.037*	0.0229*	1.025*	1.009–1.040*	0.00165*
Sex of recipient	W vs M	381	0.92	0.6412–1.333	0.674			
Immunosuppression score	Per unit increase	361	0.89	0.6472–1.216	0.457			
Acute graft rejection	Per episode increased	381	0.95	0.3891–2.342	0.919			
CMV D/R combination status	D+/R- vs other	365	2.65*	1.804–3.9*	7.12e-07*	2.709*	1.879–3.906*	9.5e-08*

\*p < 0.05.  
<sup>†</sup>Not significant after Bonferroni correction (corrected threshold of p = 0.002).  
CMV: Cytomegalovirus; D: Donor; HR: Hazard ratio; R: Recipient; M: Men; W: Women.

nistic rationale. Among these candidates, only one (*IL2* rs2069763) had previously been studied in solid organ transplantation. The GG genotype was detected in 36.8% of the patients with acute rejection and in 8.5% of patients without acute rejection in a study on 90 kidney transplant recipients grafted from living related donors (OR: 6.3 [1.8–22.15]; p = 0.005) [7]. In the present study, we found no effect of these four variants. *IL2* rs2069762 has also been the subject of several investigations, particularly in BPARs. Morgun *et al.* found higher frequency of rs2069762 TT genotype in renal transplant patients (n = 63) experiencing at least one acute rejection episode during the first 3 months post-transplantation (80 vs 49%, p < 0.05), but not in cardiac transplant patients [8]. The association of rs2069762 with BPAR was not detected in seven further studies in renal transplants [26,58–63]. The absence of association between this particular SNP and BPAR or serious infections in our study casts doubt on the clinical utility of this variant.

We did not find an effect of *PPIA* rs8177826 on BPAR, although it was previously reported to associate with nephrotoxicity in a renal transplant population [6]. Since this effect might concern ciclosporin-treated patients only (*PPIA* encodes cyclophilin, i.e., ciclosporin immunophilin), we tested this association in this subgroup of patient but found no effect either (HR: 1.173; 95% CI: 0.5622–2.448; p = 0.67). It had sufficient quality of evidence to be ranked as a potential candidate in our literature review [54]. Moore *et al.* tested the influence of *PPIA* polymorphism on death-censored allograft survival in renal transplant recipients (n = 670) using a tag-SNP panel including rs8177826 and found no association [64].

We investigated associations between our SNP-panel and the evolution of serum creatinine over the first transplant year, but no association was found (data not shown). Nephrotoxicity is closely related to long-term kidney graft outcome. Although histological examinations of graft biopsies are useful to document CNI nephrotoxicity, the diagnostic is non-specific [65,66]. No specific biomarker for CNI-related nephrotoxicity is consensually yet approved. For the future, it would be test the present panel of variants with long-term outcomes, like allograft survival on the longer follow-up period.

We did not consider the genome of the graft donor and specifically, its potential influence on the risk of acute rejection. The immune response takes place in the graft and it has been shown that kidney epithelial tubular cells express cytokines and chemokines in the context of tissue injuries [67,68]. Cytokines are not allo-specific, and donor derived proinflammatory cytokines can influence recipient immune cells. Hoffman *et al.*



found an association between chronic allograft nephropathy and the presence of the donor *IFNG*-T (+875) allele (Fisher exact test,  $p < 0.008$ ). This SNP is presumed to increase the IFN- $\gamma$  expression. The donor *IL2*-rs2069762 was also investigated as a risk factor for acute rejection and chronic allograft nephropathy but no significant association was found [68]. In this study, investigations were limited to the recipient DNA; studying *IL2* and *IL2RA* donor genes and the combination of recipient/donor genotypes in relation to acute rejection would be interesting.

## Conclusion

We hypothesized that variants in genes of the calcineurin pathway might influence the pharmacodynamics of CNi and consequently outcomes following renal transplantation. After a candidate selection based of previous clinical associations and functional studies, we did not find an association with acute rejection or serious infections risks. A multiple gene candidate approach is an alternative to genome-wide association studies involving a large number of loci, which lack adequate power in the context of restricted patient populations and complex phenotypes. This was an exploratory study and most of these variants were studied for the first time in transplantation. This approach may be useful for other phenotypes in transplantation, including metabolic adverse effects and long-term graft

survival, where the calcineurin pathway is probably involved [69].

## Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper, please visit the journal website at: [www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/pgs.15.181](http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/pgs.15.181)

## Financial & competing interests disclosure

P Marquet is a consultant for Roche France and has received speaking fees and invitations to meetings from Astellas, Novartis and Pfizer. Y Le Meur has received research grants and/or consultancy fees from Novartis, Roche, and Genzyme. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

## Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

## Executive summary

### Aim

- Few pharmacodynamic–pharmacogenetic studies on calcineurin inhibitors were conducted in transplantation.
- We investigated the potential influence of variants in genes involved in the calcineurin pathway on calcineurin inhibitors efficacy and toxicity in renal transplant recipients.
- Selection of variants studied was based on previous clinical associations and functional studies.

### Results & discussion

- No variants associated with acute kidney graft rejection or serious infection risks.
- Tacrolimus use associated with a lower incidence of acute rejection risk as compared with ciclosporin.
- D+/R- Cytomegalovirus mismatch was the most important risk factor of serious infection.
- We did not replicated previous positive associations between *IL2* rs2069763 and rs2039762 SNPs and the risk of biopsy proven acute rejection.

### Conclusion

- A multiple gene candidate approach is an alternative to genome-wide association studies in the context of complex phenotypes.
- This was an exploratory study and this panel of variants deserve to be further studied in transplantation.

## References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest; •• of considerable interest

- 1 Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* 80(4), 1483–1521 (2000).
- 2 Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, *et al.* PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet. Genomics* 23(10), 563–585 (2013).
- 3 Böhler T, Nolting J, Kamar N *et al.* Validation of immunological biomarkers for the pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs in humans. *Ther. Drug Monit.* 29(1), 77–86 (2007).
- 4 Noceti OM, Woillard J-B, Boumediene A *et al.* Tacrolimus pharmacodynamics and pharmacogenetics along the calcineurin pathway in human lymphocytes. *Clin. Chem.* 60(10), 1336–1345 (2014).

- 5 Picard N, Marquer P. The influence of pharmacogenetics and cofactors on clinical outcomes in kidney transplantation. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7(6), 731–743 (2011).
- 6 Moscoso-Solorzano GT, Ortega F, Rodríguez I *et al.* A search for cyclophilin-A gene variants in cyclosporine A-treated renal transplanted patients. *Clin. Transplant.* 22(6), 722–729 (2008).
- A report associating *PPIA* rs8177826 with nephrotoxicity in renal transplant recipients.
- 7 Seyhun Y, Mytilineos J, Turkmen A *et al.* Influence of cytokine gene polymorphisms on graft rejection in Turkish patients with renal transplants from living related donors. *Transplant. Proc.* 44(6), 1670–1678 (2012).
- A study showing that *IL2* rs2069763 associates with acute rejection in renal transplant recipients.
- 8 Morgun A, Shulzhenko N, Rampim GF *et al.* Interleukin-2 gene polymorphism is associated with renal but not cardiac transplant outcome. *Transplant. Proc.* 35(4), 1344–1345 (2003).
- A higher frequency of *IL2* rs2069762 TT genotype was found in renal transplant recipients experiencing at least one biopsy proven acute rejection episode.
- 9 Rits MAN, van Dort KA, Kootstra NA. Polymorphisms in the regulatory region of the cyclophilin A gene influence the susceptibility for HIV-1 infection. *PLoS ONE* 3(12), e3975 (2008).
- 10 An P, Wang LH, Hutcheson-Dilks H *et al.* Regulatory polymorphisms in the cyclophilin A gene, *PPIA*, accelerate progression to AIDS. *PLoS Pathog.* 3(6), e88 (2007).
- 11 Palacín M, Rodríguez I, García-Castro M *et al.* A search for cyclophilin-A gene (*PPIA*) variation and its contribution to the risk of atherosclerosis and myocardial infarction. *Int. J. Immunogenet.* 35(2), 159–164 (2008).
- 12 Le Meur Y, Büchler M, Thierry A *et al.* Individualized mycophenolate mofetil dosing based on drug exposure significantly improves patient outcomes after renal transplantation. *Am. J. Transplant.* 7(11), 2496–2503 (2007).
- 13 Le Meur Y, Thierry A, Glowacki F *et al.* Early steroid withdrawal and optimization of mycophenolic acid exposure in kidney transplant recipients receiving mycophenolate mofetil. *Transplantation* 92(11), 1244–1251 (2011).
- 14 Medical Dictionary for Regulatory Activities. [www.meddra.org](http://www.meddra.org)
- 15 Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, W71–W74 (2007).
- 16 Chiocco MJ, Zhu X, Walther D *et al.* Fine mapping of calcineurin (*PPP3CA*) gene reveals novel alternative splicing patterns, association of 5'UTR trinucleotide repeat with addiction vulnerability, and differential isoform expression in Alzheimer's disease. *Subst. Use Misuse* 45(11), 1809–1826 (2010).
- 17 Tang W, Arnett DK, Devereux RB *et al.* Identification of a novel 5-base pair deletion in calcineurin B (*PPP3R1*) promoter region and its association with left ventricular hypertrophy. *Am. Heart J.* 150(4), 845–851 (2005).
- 18 Ahmetov II, Williams AG, Popov DV *et al.* The combined impact of metabolic gene polymorphisms on elite endurance athlete status and related phenotypes. *Hum. Genet.* 126(6), 751–761 (2009).
- 19 Cruchaga C, Kauwe JSK, Mayo K *et al.* SNPs associated with cerebrospinal fluid phospho-tau levels influence rate of decline in Alzheimer's disease. *PLoS Genet.* 6(9), e1001101 (2010).
- 20 Zhao D, Qiu G-X, Wang Y-P. Is calmodulin 1 gene/estrogen receptor-alpha gene polymorphisms correlated with double curve pattern of adolescent idiopathic scoliosis? *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88(35), 2452–2456 (2008).
- 21 Mototani H, Mabuchi A, Saito S *et al.* A functional single nucleotide polymorphism in the core promoter region of *CALM1* is associated with hip osteoarthritis in Japanese. *Hum. Mol. Genet.* 14(8), 1009–1017 (2005).
- 22 Zhuang Q, Wu Z, Qiu G. Is polymorphism of *CALM1* gene or growth hormone receptor gene associated with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis? *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 87(31), 2198–2202 (2007).
- 23 Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E *et al.* Association of cytokine polymorphic inheritance and *in vitro* cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation* 72(8), 1444–1450 (2001).
- 24 Hussain SK, Madeleine MM, Johnson LG *et al.* Cervical and vulvar cancer risk in relation to the joint effects of cigarette smoking and genetic variation in interleukin 2. *Cancer Epidemiol. Biomark.* 17(7), 1790–1799 (2008).
- 25 Satoh S, Saito M, Inoue K, Miura M, Komatsuda A, Habuchi T. Association of cytokine polymorphisms with subclinical progressive chronic allograft nephropathy in Japanese renal transplant recipients: preliminary study. *Int. J. Urol.* 14(11), 990–994 (2007).
- 26 Oetting WS, Schladt DP, Leduc RE *et al.* Validation of single nucleotide polymorphisms associated with acute rejection in kidney transplant recipients using a large multi-center cohort. *Transpl. Int.* 24(12), 1231–1238 (2011).
- 27 Yucesoy B, Johnson VJ, Fluharty K *et al.* Influence of cytokine gene variations on immunization to childhood vaccines. *Vaccine* 27(50), 6991–6997 (2009).
- 28 Dhiman N, Ovsyannikova IG, Vierkant RA, Pankratz VS, Jacobson RM, Poland GA. Associations between cytokine/cytokine receptor single nucleotide polymorphisms and humoral immunity to measles, mumps and rubella in a Somali population. *Tissue Antigens* 72(3), 211–220 (2008).
- 29 van Heel DA, Franke L, Hunt KA *et al.* A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring *IL2* and *IL21*. *Nat. Genet.* 39(7), 827–829 (2007).
- 30 Márquez A, Orozco G, Martínez A *et al.* Novel association of the interleukin 2-interleukin 21 region with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 104(8), 1968–1975 (2009).
- 31 Hollis-Moffatt JE, Chen-Xu M, Topless R *et al.* Only one independent genetic association with rheumatoid arthritis within the KIAA1109–TENR–IL2–IL21 locus in Caucasian sample sets: confirmation of association of rs6822844 with rheumatoid arthritis at a genome-wide



- level of significance. *Arthritis Res. Ther.* 12(3), R116 (2010).
- 32 Zhernakova A, Alizadeh BZ, Bevoja M *et al.* Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of Type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 81(6), 1284–1288 (2007).
  - 33 Fichna M, Zurawek M, Fichna P, Ziółkowska-Suchanek I, Januszkiewicz D, Nowak J. Polymorphic variant at the IL2 region is associated with Type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. *Mol. Biol. Rep.* 40(12), 6957–6963 (2013).
  - 34 International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. *N. Engl. J. Med.* 357(9), 851–862 (2007).
  - 35 D'Netto MJ, Ward H, Morrison KM *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis in multiplex families. *Neurology* 72(23), 1984–1988 (2009).
  - 36 Kurreeman FAS, Daha NA, Chang M *et al.* Association of IL2RA and IL2RB with rheumatoid arthritis: a replication study in a Dutch population. *Ann. Rheum. Dis.* 68(11), 1789–1790 (2009).
  - 37 Alcina A, Fedetz M, Ndagire D *et al.* IL2RA/CD25 gene polymorphisms: uneven association with multiple sclerosis (MS) and Type 1 diabetes (T1D). *PLoS ONE* 4(1), e4137 (2009).
  - 38 Srivastava B, Mells GF, Cordell HJ *et al.* Fine mapping and replication of genetic risk loci in primary sclerosing cholangitis. *Scand. J. Gastroenterol.* 47(7), 820–826 (2012).
  - 39 Schmied MC, Zehetmayer S, Reindl M *et al.* Replication study of multiple sclerosis (MS) susceptibility alleles and correlation of DNA-variants with disease features in a cohort of Austrian MS patients. *Neurogenetics* 13(2), 181–187 (2012).
  - 40 Carr EJ, Clatworthy MR, Lowe CE *et al.* Contrasting genetic association of IL2RA with SLE and ANCA-associated vasculitis. *BMC Med. Genet.* 10, 22 (2009).
  - 41 Lowe CE, Cooper JD, Brusko T *et al.* Large-scale genetic fine mapping and genotype–phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in Type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 39(9), 1074–1082 (2007).
  - 42 Qu H-Q, Bradfield JP, Bélisle A *et al.* The Type I diabetes association of the IL2RA locus. *Genes Immun.* 10(Suppl. 1), S42–S48 (2009).
  - 43 Qu H-Q, Montpetit A, Ge B, Hudson TJ, Polychronakos C. Toward further mapping of the association between the IL2RA locus and Type 1 diabetes. *Diabetes* 56(4), 1174–1176 (2007).
  - 44 Redler S, Albert F, Brockschmidt FF *et al.* Investigation of selected cytokine genes suggests that IL2RA and the TNF/LTA locus are risk factors for severe alopecia areata. *Br. J. Dermatol.* 167(6), 1360–1365 (2012).
  - 45 Ban Y, Tozaki T, Taniyama M *et al.* Association of the protein tyrosine phosphatase nonreceptor 22 haplotypes with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Thyroid* 20(8), 893–899 (2010).
  - 46 Babron M-C, Perdry H, Handel AE *et al.* Determination of the real effect of genes identified in GWAS: the example of IL2RA in multiple sclerosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 20(3), 321–325 (2012).
  - 47 Aslibekyan S, Kabagambe EK, Irvin MR *et al.* A genome-wide association study of inflammatory biomarker changes in response to fenofibrate treatment in the Genetics of Lipid Lowering Drug and Diet Network. *Pharmacogenet. Genomics* 22(3), 191–197 (2012).
  - 48 Perera D, Stankovich J, Butzkueven H *et al.* Fine mapping of multiple sclerosis susceptibility genes provides evidence of allelic heterogeneity at the IL2RA locus. *J. Neuroimmunol.* 211(1–2), 105–109 (2009).
  - 49 R Foundation for Statistical Computing. [www.r-project.org](http://www.r-project.org)
  - 50 Paramesh AS, Zhang R, Baber J *et al.* The effect of HLA mismatch on highly sensitized renal allograft recipients. *Clin. Transplant.* 24(6), E247–E252 (2010).
  - 51 Abdi ZD, Prémaud A, Essig M *et al.* Exposure to mycophenolic acid better predicts immunosuppressive efficacy than exposure to calcineurin inhibitors in renal transplant patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 96(4), 508–515 (2014).
  - 52 Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A. Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 19(Suppl. 3), iii38–iii42 (2004).
  - 53 Pouché L, Avcu K, Esperón P, Noceti OM, Marquet P, Picard N. Genetic databases and their pitfalls: an example related to pharmacogenetics. *Ther Drug Monit.* 35(5), 713–714 (2013).
  - 54 Pouché L, Stojanova J, Marquet P, Picard N. New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics* (2016) (Epub ahead of print)
  - A comprehensive review of candidates genes of the calcineurin pathway with reports of previous associations with different phenotypes and highlights on the most promising candidates for pharmacogenetic studies in solid organ transplantation.
  - 55 Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A *et al.* ELITE-Symphony Study. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 357(25), 2562–2575 (2007).
  - 56 Picard N, Bergan S, Marquet P *et al.* Pharmacogenetic biomarkers predictive of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Ther. Drug Monit.* PMID: 26469711 (2015) (Epub ahead of print).
  - 57 Lefaucheur C, Nochy D, Hill GS *et al.* Determinants of poor graft outcome in patients with antibody-mediated acute rejection. *Am. J. Transplant.* 7(4), 832–841 (2007).
  - 58 George S, Turner D, Reynard M *et al.* Significance of cytokine gene polymorphism in renal transplantation. *Transplant. Proc.* 33(1–2), 483–484 (2001).
  - 59 Hoffmann S, Park J, Jacobson LM *et al.* Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on



- acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 66(4), 1686–1693 (2004).
- 60 Manchanda PK, Mittal RD. Analysis of cytokine gene polymorphisms in recipient's matched with living donors on acute rejection after renal transplantation. *Mol. Cell. Biochem.* 311 (1–2), 57–65 (2008).
  - 61 Grinyó J, Vanrenterghem Y, Nashan B et al. Association of four DNA polymorphisms with acute rejection after kidney transplantation. *Transpl. Int.* 21(9), 879–891 (2008).
  - 62 Karimi MH, Daneshmandi S, Pourfathollah AA et al. A study of the impact of cytokine gene polymorphism in acute rejection of renal transplant recipients. *Mol. Biol. Rep.* 39(1), 509–515 (2012).
  - 63 Chen Z, Bouamar R, Van Schaik RHN et al. Genetic polymorphisms in IL-2, IL-10, TGF- $\beta$ 1, and IL-2RB and acute rejection in renal transplant patients. *Clin. Transplant.* 28(6), 649–655 (2014).
  - 64 Moore J, McKnight AJ, Döhler B et al. Donor *ABCB1* variant associates with increased risk for kidney allograft failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23(11), 1891–1899 (2012).
  - 65 Naim I. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *Am. J. Nephrol.* 37(6), 602–612 (2013).
  - 66 Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 4(2), 481–508 (2009).
  - 67 Sibbring JS, Sharma A, McDicken IW, Sells RA, Christmas SE. Localization of C-X-C and C-C chemokines to renal tubular epithelial cells in human kidney transplants is not confined to acute cellular rejection. *Transpl. Immunol.* 6(4), 203–208 (1998).
  - 68 Hoffmann S, Park J, Jacobson LM et al. Donor genomics influence graft events: the effect of donor polymorphisms on acute rejection and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 66(4), 1686–1693 (2004).
  - 69 Heisel O, Heisel R, Balshaw R, Keown P. New onset diabetes mellitus in patients receiving calcineurin inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Transplant.* 4(4), 583–595 (2004).

## Affiliations

### Lucie Pouch

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Matthias Koitka

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France

### Jana Stojanova

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, Laboratory of Chemical Carcinogenesis & Pharmacogenetics, University of Chile, Santiago, Chile

### Jean-Baptiste Woillard

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Caroline Monchaud

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Claire Villeneuve

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Marie Essig

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Nephrology, Dialysis & Transplantation, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Julie Abraham

CHU Limoges, Department of Clinical Hematology, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Yannick le Meur

CHU Brest, Hôpital Cavale Blanche, Department of Nephrology, F-29609 Brest, France

### Jean-Philippe Rerolle

CHU Limoges, Department of Nephrology, Dialysis & Transplantation, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

### Nassim Kamar

CHU Toulouse Rangueil, Department of Nephrology & Organ Transplantation, F-31000 Toulouse, France; and, INSERM, U1043, Structure Fédérative de Recherche Bio-Médicale de Toulouse (SFR-BMT), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Purpan, Toulouse, France; and, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

**Lionel Rostaing**

CHU Toulouse Rangueil, Department of Nephrology & Organ Transplantation, F-31000 Toulouse, France; and, INSERM, U1043, Structure Fédérative de Recherche Bio-Médicale de Toulouse (SFR-BMT), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Purpan, Toulouse, France; and, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse, France

**Pierre Merville**

CHU Bordeaux, Department of Nephrology, Transplantation, Dialysis, F-33000 Bordeaux, France

**Peggy Gandia**

CHU Toulouse, Laboratory of Pharmacokinetics & Clinical Toxicology, F-31000 Toulouse, France

**Stephane Bouchet**

CHU Bordeaux, Department of Clinical Pharmacology & Toxicology, F-33000 Bordeaux, France

**Britt-Sabina Petersen**

Institute of Clinical Molecular Biology, Christian-Albrechts-University Kiel, Germany

**Pierre Marquet**

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

**Nicolas Picard**

Inserm, UMR 850, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France; and, Univ. Limoges, Faculty of Medicine & Pharmacy, 2 rue du Dr Marcland, F-87025 Limoges, France; and, CHU Limoges, Department of Pharmacology, Toxicology & Pharmacovigilance, 2 Avenue Martin-Luther King, F-87042 Limoges, France

## C. Discussion

Le travail de revue de la littérature a été une étape majeure dans la réalisation de cette thèse. Certains variants génétiques des acteurs du système immunitaire ont pu être mis en avant en tant que candidats biomarqueurs même si leur rôle dans la variabilité de réponse thérapeutique en transplantation n'a pour le moment pas été démontré formellement.

Parmi les 45 gènes explorés impliqués dans la réponse immune post transplantation, la plupart d'entre eux sont très polymorphiques, augmentant la probabilité de posséder des variants fonctionnels. De fait, de nombreux variants fonctionnels présents dans les gènes codants pour les cytokines ont été identifiés par Smith et col. (45). Cependant, peu d'entre eux ont été associés à la réponse clinique post-transplantation, révélant la complexité des phénotypes étudiés. Pour les 13 variants génétiques principalement étudiés en transplantation rénale, la majorité des publications rapportent des absences d'associations contre une minorité de résultats positifs, tous phénotypes confondus (Tableau 2, p.28, (46)).

Parmi ces 13, malgré 27 rapports négatifs, le SNP *TNFA* rs1800629, -308G/A a fait l'objet de 21 études positives en transplantation. Ce SNP est localisé dans le promoteur du gène *TNFA* qui code pour la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  (*Tumor necrosis factor alpha*). L'allèle A a été associé à un risque augmenté de rejet aigu dans plusieurs études indépendantes (Odd Ratios (ORs) compris entre 2,8 et 6) (46). Cependant, l'impact de ce polymorphisme sur la variabilité d'expression du gène *TNFA* n'a pas été démontré (47). Une méta-analyse, réalisée sur les données individuelles de 4 études, montre une absence d'augmentation de risque de mauvais pronostic de survie du greffon chez les porteurs de ce variant (48). Ces résultats suggèrent que la poursuite des investigations en transplantation pour ce variant représente peu d'intérêt.

Parmi les SNPs majoritairement étudiés, le SNP rs1800795 (-174) présent dans le promoteur d'*IL6* a été associé à différents phénotypes en transplantation dans une dizaine d'études, dont une étude sur ADN de donneurs, montrant une augmentation de risque de rejet aigu pour les homozygotes mutés (OR=8,67 ; p=0.0002) (49). Ce SNP semble induire une diminution claire de la transcription d'*IL6* lorsqu'il est associé à 2 autres SNPs du promoteur (les SNPs -572 G>C ou rs1800796 et -597 ou rs1800797) (47). Ce dernier n'a pas été inclus



dans une méta-analyse ne permettant pas de conclure formellement sur l'intérêt clinique de ce variant (7).

Enfin, trois méta-analyses ont été menées sur ces variants du SI majoritairement étudiés en transplantation (Cf. Tableau 2, p.28 (46)) et n'ont pas mis en évidence d'associations significatives, ni avec les rejets aigus (50) (51), ni avec le risque de mauvais pronostic de survie du greffon (critère composite composé des rejets aigus, chroniques, néphropathie chronique et perte du greffon) (48). Ainsi, les variants génétiques des principales cytokines et autres molécules signalisatrices du SI participe probablement au devenir du greffon post transplantation mais leurs effets, étudiés de façon isolée ou non, ne semblent pas suffisamment importants pour avoir un intérêt en clinique. Ceci peut également s'expliquer par le lien très indirect qu'il existe entre l'activité d'un gène codant pour une molécule du SI et le phénotype clinique : contrairement aux enzymes du métabolisme dont la variabilité génétique peut avoir un impact direct sur la pharmacocinétique du médicament, les voies cellulaires responsables de l'activation du SI sont complexes, multiples, et éloignées du phénotype clinique observé (rejets, infections graves).

L'étude de la littérature concernant les gènes « cibles » des immunosuppresseurs révèle un nombre important de pharmacogènes peu explorés dans le domaine, en particulier pour la voie de la calcineurine. L'attribution d'un « critère de qualité » basé sur la fonctionnalité de ces variants a permis d'identifier un nombre restreint de candidats potentiels. Sept candidats ont obtenu un score de 1, correspondant à un haut niveau de recommandation pour une étude en transplantation (Tableau 3, p.51 (7)). Ces variants sont présents dans les gènes codant pour la calcineurine (sous-unités catalytique A et régulatrice B) et l'IL2 (gènes *PPP3CA*, *PPP3R1* et *IL2*). Cette liste n'est cependant pas exhaustive, et devra être révisée lors de la publication de nouvelles associations. Elle a cependant l'avantage de limiter le nombre de variants à étudier, stratégie intéressante dans des études « gènes candidats », en particulier lors d'exploration de voies de signalisation cellulaire complexes comme celle de la calcineurine.

Parmi les 23 variants testés dans l'étude POLYCIS, aucun n'a été associé au risque de rejet aigu ou d'infection grave (52). Nous ne concluons cependant pas à une absence d'effet de la variabilité génétique des cibles sur la variabilité de réponse aux ICN. Il est possible que la puissance statistique ait été insuffisante ou que le choix/définition des phénotypes étudiés ne soit pas optimal. Par ailleurs, certains variants, identifiés comme étant de bons candidats

selon nos critères de recommandation n'ont pas encore été testés (7). Cependant, il semblerait que l'effet de ces variants, s'il existe, soit faible. Une combinaison de variants génétiques impliqués dans la pharmacocinétique et dans la pharmacodynamie des ICN pourrait permettre d'être plus précis dans l'étude de ces phénotypes. Il est important de souligner que l'étude du rejet aigu en transplantation devient difficile dans le cadre d'étude exploratoire de ce type. En effet, du fait de l'amélioration de l'usage des immunosuppresseurs, l'incidence des rejets aigus a beaucoup diminué ; mettre en évidence l'effet (souvent modeste) d'un variant génétique sur ce risque nécessite d'avoir à disposition une population de taille importante. Dans cet objectif, nous avons inclus des patients traités par CsA et par TAC, représentant au total 381 patients transplantés rénaux. Du fait d'un risque basal de rejet aigu différent entre les patients traités par CsA ou par TAC (53), les analyses ont été stratifiées sur la nature de l'ICN. Ainsi, l'influence de chaque variant sur les phénotypes « rejet aigu » ou « infection grave », quantifié par l'*Hasard Ratio* (HR), est « pondérée » par le risque lié à la prise de CsA ou de TAC. Malgré l'avantage de conserver une bonne puissance statistique, cette technique ne permet pas de différencier l'impact d'un variant dans chacune des deux sous-populations. Ce panel de SNPs candidats mérite d'être exploré ultérieurement au travers d'autres phénotypes en transplantation, notamment le diabète post transplantation ou NODAT (*New Onset Diabetes After Transplantation*). Cette pathologie est multifactorielle, et le rôle du régime immunosuppresseur, notamment les corticostéroïdes ainsi que la prise de TAC, a été identifié (54). Certains variants génétiques ont été associés au risque de développer un NODAT, notamment dans le gène *PPARα* (rs4253728) codant pour un récepteur nucléaire impliqué dans le métabolisme lipidique (55), et dans le gène *KCNQ1* (rs2237895), codant pour un récepteur potassique exprimé au sein des cellules pancréatiques (56). De plus, la voie de la calcineurine semble jouer un rôle important dans la régulation de sécrétion d'insuline au sein des cellules β-pancréatiques. Un haplotype (T-T-T-T-G) présent dans le gène *NFATC4* a été identifié comme protecteur contre le développement d'un NODAT chez des patients transplantés rénaux (57).

Ces travaux étaient limités aux gènes impliqués dans des voies cellulaires connues. Le développement des techniques de séquençage haut débit donne la possibilité d'explorer d'avantage de régions du génome de manière simultanée. Ces techniques sans *a priori* ont notamment permis de détecter certains variants rares (de fréquence généralement inférieure à 5% dans la population) non étudiés jusqu'à alors et dont le rôle semble important dans

l'expression de certains traits phénotypiques (58). Par ailleurs, les résultats du consortium ENCODE ont révélé de nouveaux mécanismes de régulation d'expression des gènes et ouvrent de nouvelles possibilités pour expliquer la fonctionnalité de certains variants. Notamment, de nombreux SNPs ont été identifiés par des études GWAS comme étant susceptibles de participer à certaines pathologies, mais sans fonctionnalité biologique apparente car localisés dans des régions non codantes du génome. Maurano et col. montrent que nombreux de ces variants sont localisés dans des régions *enhancers*, situés parfois à des milliers de paires de base de distance du gène dont l'expression était régulée. Certaines variations génétiques pourraient donc avoir des conséquences sur l'expression de gènes cibles très éloignés (59). Ce type d'étude représente une perspective enthousiasmante pour expliquer la variabilité pharmacodynamique des ICN.



# Chapitre 3. Modifications épigénétiques induites par l'exposition aux ICN

## A. Hypothèses et justification de l'étude

### 1. Régulation épigénétique par des médicaments « non épigénétiques »

La thérapie épigénétique tente de corriger les anomalies de la signalisation amenant à une aberration d'expression génique, par l'usage de médicaments épigénétiques, ou *epi-médicaments* (*epi-drugs*). On qualifie de « médicaments épigénétiques » ceux ayant pour cible des protéines de la régulation épigénétique (i.e. DNMTs, Histone méthyltransférase, etc.) (60). Cependant, certains médicaments « non épigénétiques » ont également la capacité d'influencer la méthylation de l'ADN ou les marques épigénétiques des histones, par interaction non spécifique avec les enzymes responsables de l'écriture, lecture et de l'enlèvement des marques, ou avec les voies de signalisation en amont ou en aval de la signalisation épigénétique (61). La méthylation de l'ADN est la marque épigénétique la plus étudiée et la mieux connue à l'heure actuelle. Des modifications du profil basal de méthylation ont été associées à l'exposition à certains xénobiotiques et pourraient expliquer certains effets indésirables (62). A titre d'exemple : le diéthylstilbestrol, connu pour être pourvoyeur de cancers génitaux chez la femme diminue l'expression de certaines DNMTs ainsi que le niveau de méthylation d'ADN de cellules utérines de souris en période néonatale (63). Une exposition prolongée au phénobarbital, antiépileptique de première génération, augmente l'incidence des carcinomes hépatocellulaires chez la souris. L'accumulation de régions géniques altérées en méthylation et hydroxyméthylation, associée à des anomalies transcriptomiques, a été observée précocement après l'exposition au médicament (62).

### 2. Régulation fonctionnelle du LT CD4

Les mécanismes épigénétiques impliqués dans la différenciation et le développement des LT CD4 sont de mieux en mieux identifiés.

Après son activation, le développement du LT CD4 est orienté vers la différenciation en cellule effectrice (Th1, Th2 ou Th17), ou régulatrice (Treg). Une fois différencié, son

phénotype peut de nouveau être orienté vers une nouvelle fonction, un phénomène qualifié de « switch ». Ces processus de spécialisation et de switch sont guidés par les marques épigénétiques. Les gènes concernés et les marques identifiées ont été récemment répertoriés par Suárez-Álvarez et col. (Tableau 1) (64). La plupart de ces gènes sont dits « en état d'équilibre » (*poised stage*) : certaines marques « répressives » et « permissives » des histones sont co-exprimées à proximité des gènes et semblent former un état d'équilibre de l'expression génique. Lors de la différenciation des LT, certains gènes s'expriment fortement dans la cellule spécialisée, et restent éteints dans les autres (31). Certains loci avec des variations de méthylation de l'ADN ont été identifiés (Tableau 2).

Tableau 1. Gènes identifiés par Suárez-Álvarez et col. et les modifications épigénétiques rapportées lors de la différenciation des cellules immunitaires (64)

Gene	Type cellulaire	Fonction	Modification épigénétique rapportée
<i>IFNG</i>	CD4 (Th1), CD8, NK	Interleukin	DNA methylation, histone acetylation and methylation
<i>TBX21 (T-bet)</i>	CD4 (Th1)	Transcription factor	DNA methylation, bivalent domains
<i>IL4</i>	CD4 (Th2)	Interleukin	DNA methylation, histone methylation
<i>IL13</i>	CD4 (Th2)	Interleukin	DNA methylation
<i>GATA3</i>	CD4 (Th2)	Transcription factor	Bivalent domains
<i>IL17</i>	CD4 (Th17)	Interleukin	DNA methylation
<i>RORC (ROR-<math>\gamma</math>t)</i>	CD4 (Th17)	Transcription factor	DNA methylation, bivalent domains
<i>FoxP3</i>	CD4 (Treg)	Transcription factor	DNA methylation, histone acetylation
<i>CCR6</i>	CD4	Chemokine receptor	DNA methylation
<i>CD40L</i>	CD4	Costimulatory molecule	DNA methylation
<i>IL2</i>	CD4, CD8	Interleukin	DNA Methylation, histone acetylation
<i>PDCD1 (PD1)</i>	CD8	Costimulatory molecule	DNA methylation
<i>EOMES</i>	CD8, NK	Transcription factor	Histone acetylation
<i>GRZB</i>	CD8, NK	Cytotoxic molecule	Histone acetylation
<i>PRF1</i>	CD8, NK	Cytotoxic molecule	DNA methylation, histone acetylation
<i>KLRK1 (NKG2D)</i>	NK, CD8	Activating receptor	DNA methylation, histone acetylation
<i>KIRs</i>	NK	Activating and inhibitory receptor	DNA methylation and histone methylation
<i>FASL</i>	NK	Apoptosis	DNA methylation, histone acetylation
<i>CD19</i>	B	Surface receptor	DNA methylation
<i>PRDM1 (BLIMP1)</i>	B	Transcriptional repressor	Histone methylation
<i>IL10</i>	Mo, DC, B, Treg	Interleukin	DNA methylation
<i>IL1B</i>	Mo, M $\Phi$	Interleukin	DNA methylation
<i>CD209</i>	DC, M $\Phi$	Surface receptor	Histone acetylation and methylation

Bivalent domains, H3K4me3/H3K27me3; Mo, monocyte; M $\Phi$ , macrophage; DC, dendritic cells; NK, natural killer cells

Tableau 2. Locus avec variation de la méthylation de l'ADN en lien avec certaines fonctions des LT CD4 (MBD2 : *methyl-CpG binding domain protein 2*, Diff. : différenciation).

Locus explorés	Effet de la méthylation de l'ADN sur l'expression	Rôle	Ref.
<b>Promoteurs d'<i>IL4</i> et d'<i>IFNG</i></b>	La modulation d'expression de <i>IFNG</i> et d' <i>IL4</i> , via la fixation des facteurs T-bet et GATA3, induit des modifications de méthylation au niveau de leurs promoteurs	Diff. Th1, Th2	(65)
<b>Promoteur d'<i>IFNG</i></b>	Le promoteur d' <i>IFNG</i> devient méthylé lors de la différenciation en Th2, et reste à l'état déméthylé dans les cellules naïves et les cellules Th1.	Diff. Th1, Th2	(66)
<b>Région intergénique <i>IL4-IL13</i></b>	Deméthylation importante de l'ADN détecté lors du développement Th2 (traitement par 5-azacytidine, inhibiteur de DNMT et sur modèle cellulaire T MBD2-déficient)	Diff. Th1, Th2	(66)
<b>Intron2 d'<i>IL4</i> Promoteur d'<i>IL13</i></b>	Deméthylation partielle TH2 spécifique (lymphocytes T humains)	Diff. Th2	(64)
<b><i>FoxP3</i></b>	Traitement par la 5-azacytidine, inhibiteur de la méthylation, affecte l'expression de <i>Foxp3</i> durant la génération de Treg	Fonction des Treg	(66)
<b><i>FoxP3</i></b>	Promoteur (-250, +1) méthylé chez les cellules naïves T CD4 CD25, hautement déméthylé chez les nTregs chez l'homme et la souris, Des régions CpG contenues dans le corps du gène (+4393 to +4506 pb) perdent leurs méthylations après la signalisation TCR et activation de TGFβ, Une région <i>enhancer</i> en amont (-5786 to -5558 pb) identifiée comme méthylée chez les Treg activés par TGBβ et déméthylée chez les Tregs naïfs.	Fonction des Treg	(67)
<b>Promoteurs d'<i>IL2</i> et de GMCSF (<i>Csf2</i>)</b>	Deméthylation rapide de l'ADN au niveau des promoteurs d' <i>IL2</i> et <i>Csf2</i> après stimulation de LT murins. Le niveau bas de méthylation est maintenu durant toute la durée du traitement.	Activation des LT	(68)
<b>Locus <i>LTA-TNF</i></b>	Le niveau de méthylation au niveau du promoteur proximal de <i>TNF</i> est corrélé à l'expression en ARNm de <i>TNF</i> , Les promoteurs de <i>TNF</i> et <i>LTA</i> sont hypométhylés chez les lymphocytes primaires, La deméthylation au niveau du promoteur et du premier exon de <i>TNF</i> est corrélé avec la différenciation cellulaire et augmente la capacité d'exprimer TNF des LT.	Activation des LT	(69)



### 3. Méthylation de l'ADN, en quête de biomarqueurs de la variabilité pharmacodynamique

De par la réversibilité de ces marques, on peut penser que des facteurs endogènes (cytokines) ou exogènes (agents infectieux ou médicaments) modifient le statut épigénétique, l'expression de certains gènes et ainsi l'organisation de la réponse immunitaire chez un patient transplanté.

A l'heure actuelle, la variabilité de réponse *via* la possible influence des ICN sur la régulation épigénétique n'a jamais été étudiée. Comprendre l'influence d'un médicament sur l'épigénome requiert une étude sur un modèle contrôlé. Dans un premier temps, il nous a semblé pertinent d'utiliser un modèle non transplanté. En effet, la transplantation d'organe et les événements post-transplantations ont une influence sur les cellules immunes du receveur. Rodriguez et col. s'est intéressé à la transmission des marques méthylées de l'ADN lors d'allogreffe de cellules hématopoïétiques. Il montre que le niveau global de méthylation d'ADN des cellules sanguines périphériques du receveur à 1 mois et 12 mois post-transplantation correspond à celui du donneur, suggérant une sorte de maintenance de la marque 5mC malgré l'adaptation des cellules à un nouvel environnement. De plus, la méthylation des promoteurs de *FASL* et d'*IFNG* est diminuée dans le groupe de patients ayant développé une réaction du greffon contre l'hôte (GVH). L'expression d'*IFNG*, corrélé au niveau bas de méthylation de son promoteur, est en lien avec la différenciation Th1 des LT CD4 (voir Tableau 2). Le suivi du niveau de la méthylation de ces 2 promoteurs est proposé en tant que biomarqueurs candidats pour l'étude des GVH (70). Une autre équipe s'est intéressée au niveau de méthylation de 2 gènes, détectables dans l'urine de patients transplantés rénaux (calcitonine (*CALCA*) et *death-associated protéine kinase* (*DAPK*) associés à des processus de cancérogénèse). Des différences de niveau de méthylation ont été trouvées, d'une part entre les greffons issus de donneurs vivants et ceux issus de donneurs décédés, et d'autre part, entre les patients sujets à un rejet aigu et ceux n'en ayant pas développé. Cependant, l'étude a été réalisée sur un très petit nombre de patients (n=23) (71).

Il existe déjà quelques exemples d'utilisation de la méthylation d'ADN dans le suivi clinique de pathologies. A titre d'exemple, l'hyperméthylation du gène *MGMT* (O-6-méthyl-guanine méthyl-transférase) est utilisée comme marqueur de bon pronostic dans le traitement du glioblastome. Cet ADN tumoral est détecté dans le sérum et la salive des patients traités par témozolomide (72).

#### 4. Justification de l'étude

Dans notre exploration des causes de la variabilité de réponse aux ICN, il nous semblait important d'évaluer l'effet d'une prise médicamenteuse au long cours sur la régulation épigénétique des cellules cibles. Ceci pourrait en effet expliquer une partie de la variabilité d'expression génique du LT CD4, à l'origine d'une sur-immunosuppression ou sous-immunosuppression participant au risque de rejet aigu, de cancers ou d'infections graves par exemple.

L'analyse de la méthylation d'ADN des LT CD4 était le deuxième objectif de mon travail de thèse. La méthylation de l'ADN comme marqueur d'influence médicamenteuse a été choisie dans ce travail car d'une part, le mécanisme associé à l'effet de la marque 5mC sur l'expression génique est connu dans les régions promotrices et *enhancers* des gènes (cf. Chapitre 1) et d'autre part, elle semble adaptée aux études cliniques. En effet, la température ambiante n'est pas à l'origine d'une dégradation de la méthylation et cette marque est conservée lors de l'extraction de l'ADN. Enfin, le LT CD4 a été choisi ici car il est la cible des ICN et contrairement aux cellules rénales demandant une biopsie d'organe, c'est un type cellulaire facilement accessible chez l'homme à partir d'un prélèvement de sang périphérique.

Nous avons tout d'abord choisi de travailler sur le modèle cellulaire JURKAT, lignée de cellules T immortalisées, afin de développer nos méthodes d'études et d'étudier l'influence directe de l'exposition des ICN sur le LT. Les conditions de culture et leur caractère immortalisé permettaient d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour un développement de méthode, conditions plus difficilement obtenues avec des cellules lymphocytaires humaines *ex-vivo*. Ensuite, afin d'étudier l'influence du traitement sur la méthylation dans un environnement biologique complexe, nous avons mené une étude *in vivo* sur un modèle murin exposé à la ciclosporine (CsA) ou au tacrolimus (TAC) sur différentes périodes (de 7 jours à 3 mois), puis étudier la méthylation d'ADN des LT CD4 murins.

La méthylation d'ADN a été étudiée à l'aide de la méthode MeDIP. En effet, dans ce contexte exploratoire, une étude de la modification globale du méthylome par immunoprécipitation nous semblait adaptée. Premièrement, la détection de la marque méthylée était ciblée sur le promoteur du gène cible *IL2* par méthode PCR. Deuxièmement, une approche sans *a priori* par séquençage de l'ensemble des fragments d'ADN immunoprécipités a été choisie (Méthode MeDIP-seq).

## **B. Travaux personnels : modification dynamique de la méthylation de l'ADN des LT CD4 après exposition à la ciclosporine et au tacrolimus**

### **1. Matériels et méthodes**

#### **a. Culture cellulaire**

Les cellules de type JURKAT étaient issues d'une lignée lymphocytaire immortalisée de type T (clone E-6-1 : ATCC TIB-152<sup>TM</sup>). Ces cellules étaient cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, dans un milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®, Life Technologies, France) supplémenté avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Gibco®) et 1% de solution d'antibiotique (pénicilline/streptomycine ; Sigma-Aldrich, France) sur des plaques 24 puits. Après quelques jours de culture, les cellules étaient activées par l'association acétate de phorbol myristate 100 ng/mL (PMA, Sigma-Aldrich) et ionomycine 0,5 µM (Sigma-Aldrich). De façon simultanée, les cellules étaient traitées par 5 µM de CsA ou 0,05 µM de TAC, concentrations choisies du fait de leur activité toxique sur la lignée cellulaire rénale LLC-PK, sur la base de travaux réalisés antérieurement au sein de l'unité (non publiés). Les cellules contrôles non traitées et non activées ont été exposées au méthanol (1%), véhicule des solutions médicamenteuses. Les cellules étaient collectées après 24 heures d'exposition.

#### **b. Développement du MeDIP-qPCR**

##### *i. MeDIP*

Le kit MagMeDIP (Diagenode, Liège, Belgique) a été utilisé selon les recommandations du fournisseur. Certaines étapes du protocole ont été adaptées à l'étude et sont décrites ci-dessous :

- A partir du culot cellulaire, une extraction d'ADN était réalisée par méthode phénol/chloroforme/alcool iso amylique (25/24/1) (protocole détaillé en annexe 1). Les solutions tampons et enzymatiques utilisées provenaient du Kit MagMeDIP.
- La sonication de l'ADN a été réalisée à l'aide du sonicateur S220 Covaris<sup>TM</sup> (Woburn, Massachusetts, USA) disponible à la plateforme « génome



transcriptome » de l'université de Bordeaux 2 (conditions appliquées : Duty Factor : 10%, Peak Incident Power : 175W, Cycles per burst : 200, Durée : 180sec).

- Des molécules d'ADN non humains, hyperméthylé (meDNA control) et hypométhylé (unmeDNA control), ont été ajoutées à l'ADN d'intérêt en tant que contrôle externe. Une fraction de la solution (7,5 µL, représentant 10% de l'échantillon) non immunoprécipitée, était conservée à +4°C jusqu'aux analyses par qPCR pour normalisation (input).
- L'anticorps utilisé était le 5-mC monoclonal antibody 33D3 – Premium (réf GF-004, spécificité mixte : humain et souris), à la concentration indiquée par le fournisseur. L'incubation ADN- anticorps était réalisée durant la nuit.
- 

## ii. Analyse par qPCR

Deux types de contrôles ont été effectués :

- Contrôles internes au génome humain : analyse des promoteurs de *TSH2B* (hyperméthylé) et de *GAPDH* (hypométhylé) (essais SYBR GREEN, couples d'amorces disponibles dans le kit MagMeDIP)
- Contrôles externes : analyse des ADNs non humains, hypométhylé et hyperméthylé (couples d'amorces disponibles dans le kit MagMeDIP).

Le promoteur d'*IL2* a été étudié à l'aide d'un essai TaqMan (Custom TaqMan Design Assay, Life Technologies) (Tableau 3).

Tableau 3. Séquence de l'essai TaqMan utilisé pour l'étude d'*IL2*

Locus	Assay ID	Essai TaqMan
Promoteur proximal	AIY9ZWA	Amorce sens : cacctacatccattcagtcagtctt Amorce anti-sens : gtcacagaagaggaaaaatgaaggtaatg Sonde : ggggttaaagaaattccaaag

Les conditions d'utilisation des essais étaient les suivantes :

- Concernant les essais SYBR green : activation de la polymérase : 95°C 7 min, dénaturation / élongation: 95°C 15 sec / 60°C 1 min, 40 cycles, courbe de fusion : de 65°C à 95°C, augmentation de 0,5°C par cycles, 1 min (SYBR® Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Scientific).
- Concernant l'essai TaqMan : activation UNG (*AmpErase Uracil N-Glycosylase*) : 50°C 2 min, activation de la Taq Polymérase: 95°C 10 min, dénaturation / élongation: 95°C 15sec / 60°C 1 min, 40 cycles (TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Scientific).

### c. Expérimentation animale

Des souris mâles de la lignée congénique C57BL/6J ont été utilisées. Trois groupes ont été constitués en fonction des traitements reçus (CsA, à 30mg/kg/jour, TAC, à 2mg/kg/jour et contrôle, Ctrl) et traités quotidiennement par injection intra péritonéale durant 1, 8, 28, 63 et 83 jours (n=3 pour chaque condition expérimentale et par temps d'exposition, n total=45). A la fin du traitement, le sang total était prélevé par ponction intracardiaque après anesthésie des souris (solutions de kétamine à 100mg/kg et xylazine à 10mg/kg). La rate était prélevée, nettoyée dans 1ml de PBS, broyée à l'aide d'un scalpel dans 2ml de RPMI (RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, Life Technologies TM) et passée sur filtre de 70µm. La solution cellulaire obtenue était centrifugée à 1500 rpm pendant 10 min à +4°C.

Un rein et un lobe hépatique ont également été prélevés après lavage de l'organe par injection de PBS/EDTA au niveau de la veine cave caudale, puis conservés à -80°C dans une solution de type All protect (QIAGEN) pour analyses ultérieures.

La solution de CsA a été préparée à partir d'une solution mère à 50mg/ml (Sandimmune® Injection, Novartis), d'éthanol 100%, de Cremophor EL® (Calbiochem®) (huile de ricin) et d'un soluté glucosé à 5%. La solution de TAC a été préparée à partir d'une poudre (Tacrolimus 99% 100mg, VWR®), d'éthanol à 100%, de Cremophor EL® et d'un soluté glucosé à 5%. La solution contrôle contenait un mélange d'éthanol 100%, de Cremophor EL® et de glucose à 5%.

Les anesthésiques ont été dilués dans du sérum physiologique (Chlorure de Sodium 0,9% ; Baxter) à partir de solutions mères de kétamine (Imalgene® 500, Centravet) (50mg/ml) et de xylazine (Rompun® 2%, Centravet) (20mg/ml).

#### **d. Isolation des LT CD4 murins**

Le sang total et la solution cellulaire de rate étaient incubés à l'obscurité avec un tampon de lyse des hématies pendant 8 minutes (tampon Amonium-Chloride-Potassium (ACK), 3ml de tampon pour 100µl de matrice biologique). Ce tampon a été préparé avec du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (chlorure d'ammonium, 8,26g/l), du  $\text{KHCO}_3$  (bicarbonate de potassium, 1g/l) et de l'EDTA  $\text{Na}_2$  (0,03g/l). 20 ml de RPMI était ajouté pour arrêter la réaction de lyse. Après centrifugation (1200 rpm, 10 min à +4°C), les culots cellulaires de sang et rate étaient repris dans 1 ml de PBS.

L'homogénat était filtré sur colonne MS (Columns MS, Miltenyi Biotech) pour procéder à une sélection positive de cellules CD4 à l'aide des microbilles magnétiques couplées à des anticorps anti-CD4 (CD4 L3T4 MicroBeads mouse, Miltenyi Biotech, 10 µl pour  $10^7$  cellules).

La pureté des LT CD4 a été évaluée par Cytométrie de Flux (CMF) (FacsCalibur, Becton Dickinson), en utilisant des anticorps BD Pharmingen™ FITC rat anti-mouse CD4, BD Biosciences® (0,5 µl d'anticorps pour  $10^6$  cellules).

#### **a. MEDIP-seq**

Un protocole MEDIP-SEQ a été développé pour l'Ion Proton™ System (Life Technologies) de la plateforme GénoLim, à partir de la publication de Corley (73) et de la thèse de Sengenès (74). Détaillé en Annexe 2, les principales étapes sont représentées en Figure 12.



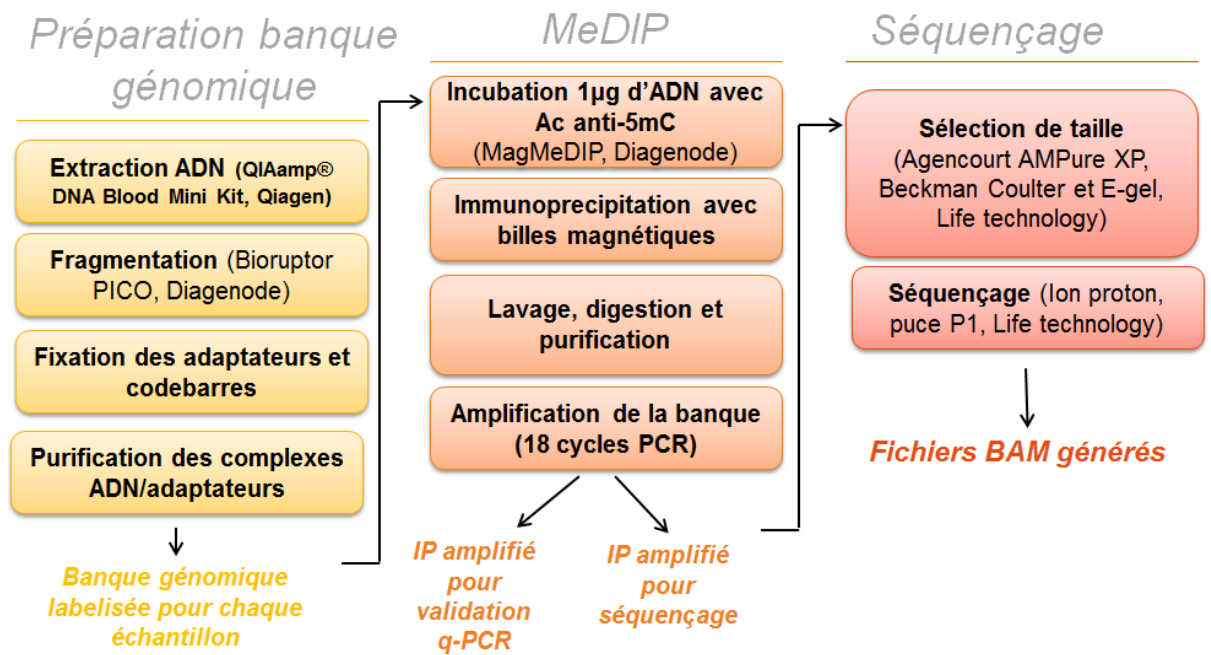


Figure 12. Work flow du protocole MeDIP-seq (IP: immunoprécipitat).

#### b. Validation de la MeDIP par qPCR

Un contrôle de l'immunoprécipitation a été effectué sur des souris non traitées pour valider notre protocole avant l'étape du séquençage (Figure 12). Après amplification de la banque génomique, une fraction de l'IP était conservée puis les régions internes du génome murin contrôles de la méthylation ont été analysées par qPCR, au niveau des promoteurs des gènes *Gapdh* (contrôle hypométhylé) et *Tsh2b* (contrôle hyperméthylé) (couple d'amorces disponibles dans le kit MagMeDIP).

#### c. Analyse bio-informatique

Les analyses bio-informatiques ont été menées sur Linux, à l'aide d'outils de retraitement des données NGS disponibles sur le serveur du *Novartis Institute of Biomedical Research* (NIBR), Bale, Suisse. Les étapes du retraitement de données de séquençage sont présentées en Figure 13.

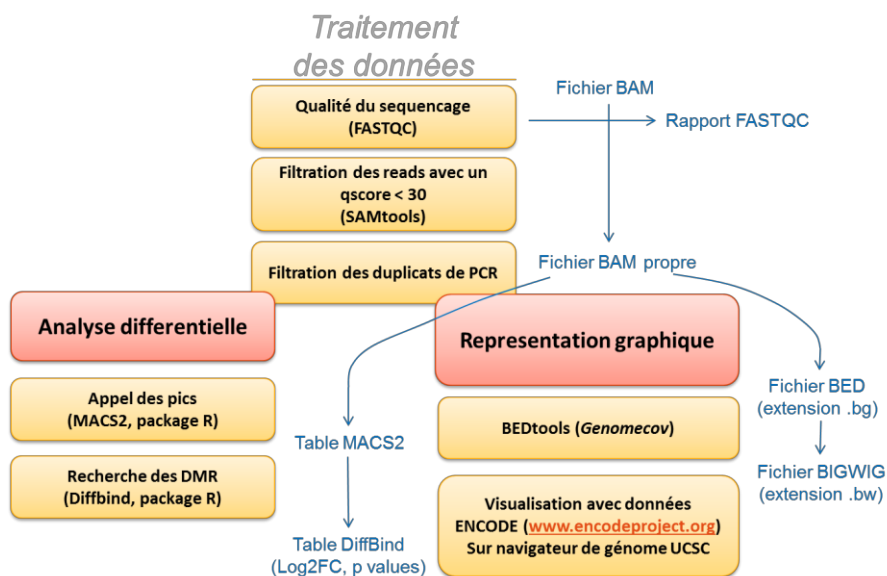


Figure 13. Workflow du traitement bio-informatique des données de séquençage. Le circuit bleu correspond aux types de fichiers d'entrée et de sortie. (qscore : score de qualité d'alignement, DMR : *differentiated methylated regions*)

#### i. Qualité du séquençage

Lors de l'alignement sur le génome de référence *mus musculus* mm10, un fichier BAM (*Binary Alignment Map*) est généré. Le fichier BAM est une forme condensée du fichier SAM (*Sequence Alignment Map*). La qualité des reads (fragments lus) produits par le séquenceur a été évaluée à l'aide du logiciel FASTQ (Babraham Institute, (75)).

#### ii. Nettoyage du fichier BAM (*SAM Tools et Mark duplicates*)

Le fichier BAM a été « nettoyé » de façon à conserver une information de qualité suffisante pour effectuer une analyse différentielle de la méthylation. SAM Tools est un outil de visualisation, d'édition et de formatage des fichiers SAM ou BAM (76). La commande *view* a été utilisée pour filtrer et exclure les reads possédant un score d'alignement inférieur à 30 (*qscore*). Les duplicats de PCR ont ensuite été marqués à l'aide de l'outil Mark Duplicate (disponible sur la plateforme Git Hub, [broadinstitute.github.io/picard/command-line-overview.html](https://broadinstitute.github.io/picard/command-line-overview.html)) puis filtrés à l'aide de SAM Tools. En effet, l'étape d'amplification PCR

avant le séquençage peut avoir introduit un biais en ayant enrichi des zones du génome de façon inégale.

### iii. *Identifications des pics (MACS2)*

Lors de l'alignement, les reads ont été superposés au génome de référence. Pour identifier les régions génomiques avec des différences de méthylation, des zones d'enrichissement appelées « pics » doivent être identifiées parmi les reads superposés. Pour cela, l'algorithme MACS2 (*Model-Based Analysis of ChIP-Seq*, v2) a été utilisé (<https://pypi.python.org/pypi/MACS2>) (77). Le fichier de sortie est un tableau contenant les informations des pics identifiés : chromosome, position de début et de fin, longueur, taille et score de confiance des pics.

### iv. *Analyse différentielle*

Le package *DiffBind* a été utilisé (interface R studio) (78) (79). A partir des pics identifiés par MACS2 et des fichiers BAM, il permet de sélectionner ceux présents dans les échantillons ayant reçu le même traitement, puis analyse la distribution différentielle entre les groupes « traités » versus « non traités ». *Diffbind* identifie les *genomic features*. On qualifie de *genomic feature* tout élément fonctionnel ou autre annotation du génome identifié lors d'une analyse de séquençage. Dans notre étude, il s'agissait de régions avec des différences de méthylation ou DMRs (*differentiated methylated regions*).

Premièrement, le fichier d'entrée requis par *Diffbind* a été construit. Il s'agissait d'un tableau contenant les fichiers MACS2, BAM et les informations relatives aux conditions de traitements (durée d'exposition, traitement, réplicats) des échantillons à comparer (objet DBA pour *DiffBind Analysis*).

Ensuite, une matrice contenant les *counts* pour chaque échantillon a été générée (fonction *count* du même package). La fonction compte les *reads* localisés sous les pics identifiés par MACS2. Cela permet d'augmenter le niveau de confiance des pics identifiés par MACS2 (Figure 14). Seuls les pics présents dans au moins 2 des échantillons ont été conservés pour la suite de l'analyse.



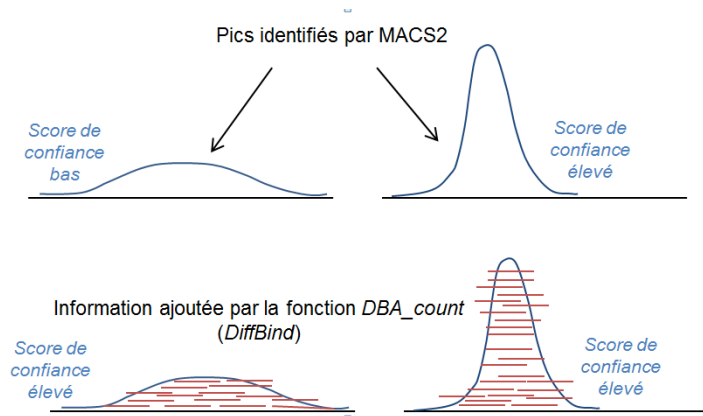


Figure 14. Fonction *DBA\_count*

La fonction *contrast* a permis de définir 2 groupes d'échantillons séparés par le traitement. Un minimum de 2 réplicats par groupe est requis dans cette analyse.

L'analyse différentielle est basée sur la fonction d'analyse du package, son fonctionnement est basé sur le module EdgeR (package EdgeR) (80)(81). Le facteur de variabilité technique le plus important est la différence de profondeur de séquençage entre chaque échantillon. Ainsi, EdgeR ajuste l'analyse différentielle sur la variabilité de profondeur de séquençage des librairies. Le signal est normalisé en « *pseudo-counts* » (nombre de reads d'une région divisé par un nombre total de reads).

Les régions d'intérêts ont été identifiées à l'aide d'un test exact, contenu dans le module EdgeR, en comparant la distribution des pics dans les 2 groupes. Le fichier de sortie était un tableau contenant les *log2 fold change* (ratio des *pseudo-counts* du groupe échantillon traité / échantillon contrôle), les petits p (non corrigés) et les *False discovery rates* (FDR, correspondant à un p corrigé selon la technique de Benjamini-Hochberg) pour chacun des pics conservés (80). Seules les régions avec une  $FDR < 0,1$  ont été conservées.

#### v. Visualisation des régions d'intérêts

Les fichiers BAM ont été convertis en fichier BedGraph puis en fichier BigWig pour permettre une visualisation des enrichissements, sur le navigateur du génome UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>) (Figure 15) (outil Bed tools v.2.25.0, (82)).

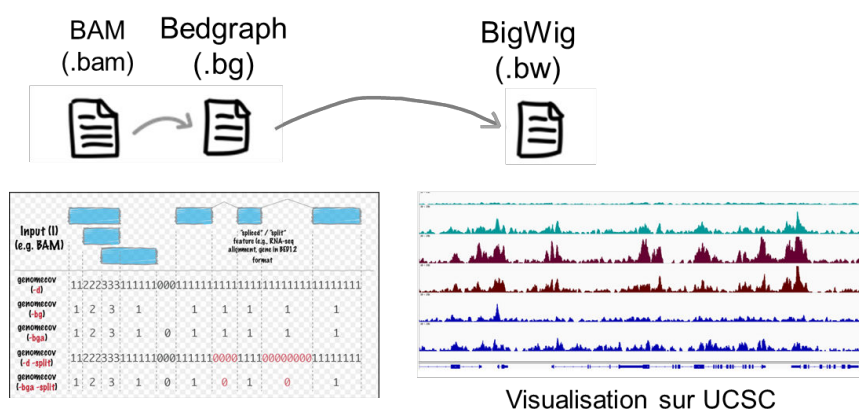


Figure 15. Conversion du fichier BAM en fichier BigWig

L'ensemble des scripts et lignes de commande utilisés pour la réalisation de ces analyses sont donnés en Annexe 3.

## 2. Résultats

### a. MeDIP-qPCR sur le modèle JURKAT

L'analyse de la méthylation d'ADN à l'aide de la méthode MeDIP sur le modèle cellulaire JURKAT est présentée en Figure 16.

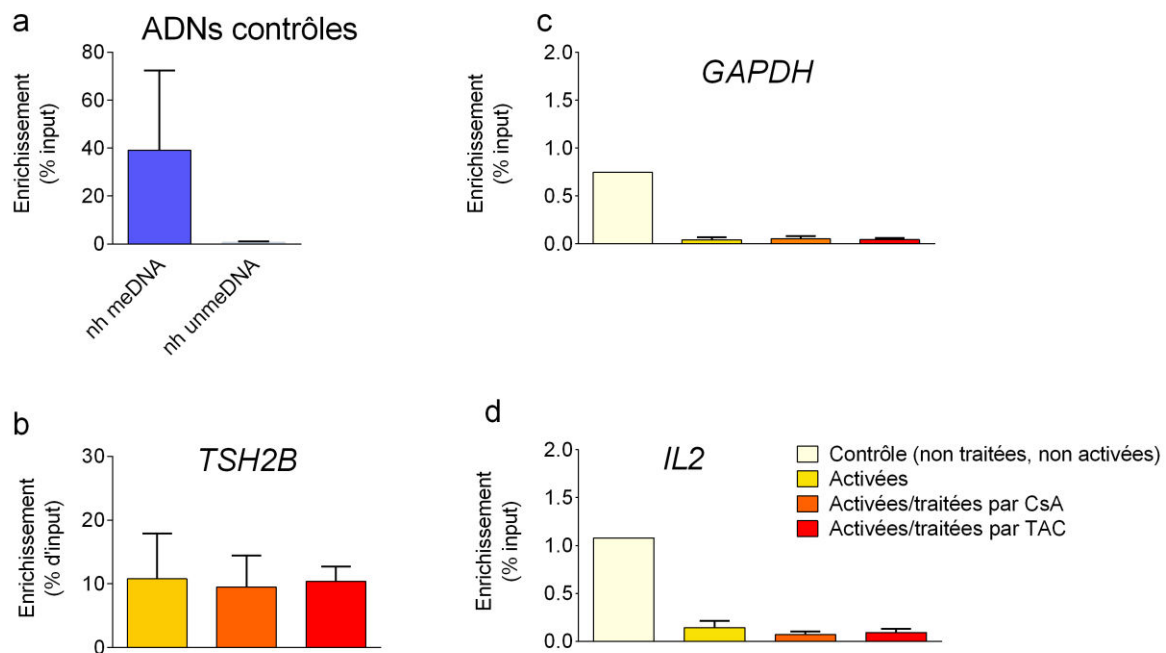


Figure 16. Enrichissement de la méthylation de l'ADN, exprimé en % d'input (fraction d'ADN non immunoprécipité) de la lignée JURKAT pour (a) les ADNs contrôles non humains (nh meDNA : non human methylated DNA, nh unmeDNA : non human unmethylated DNA), (b) le promoteur de *TSH2B*, (c) le promoteur de *GAPDH* et (d) le promoteur d'*IL2* dans le modèle cellulaire JURKAT après activation et/ou traitement par ICN (CsA : ciclosporine, TAC : tacrolimus) (représenté par la moyenne et l'écart type obtenus sur réplicats biologiques).

Les contrôles externes ont été réalisés pour valider deux expériences de MEDIP réalisées à deux périodes différentes et montrent une grande variabilité d'enrichissement en fonction du temps. Environ 15 et 60% d'input des échantillons sont enrichis pour l'ADN hyperméthylé ; nous ne retrouvons pas d'enrichissement pour nos échantillons pour l'ADN hypométhylé. Les résultats observés pour les promoteurs de *GAPDH* et de *TSH2B* confirment l'enrichissement de zones hyperméthylées du génome. Pour les conditions « Activées », « Activées/traitées par CsA », et « Activées/traitées par TAC », la région promotrice de



*TSH2B* (connue pour être compactée en hétérochromatine et riche en marque méthylée de l'ADN) est enrichie (entre 6 et 15% de l'input). La région promotrice de *GAPDH* (connue pour être constitutivement active et pauvre en méthylation CpG) ne montre aucun enrichissement pour les 4 conditions (% d'input entre 0,02 et 0,7% d'input).

Concernant le promoteur d'*IL2*, une absence d'enrichissement est observée en condition contrôle. Nous ne montrons pas d'effet sur la méthylation après activation cellulaire par PMA/ionomycine, ni après exposition à la ciclosporine ou au tacrolimus durant 24 heures (Figure 16d).

Par manque de matériel biologique, l'enrichissement de *TSH2B* dans l'échantillon contrôle est manquant. De plus, les réplicats de MeDIP réalisés sur cet échantillon n'ont pas fonctionné. Ainsi, les enrichissements des régions promotrices d'*IL2* et de *GAPDH* en condition contrôle sont présentés sans indicateur de variabilité (Figure 16, c et d).

Nous montrons que la méthode MeDIP est efficace dans notre étude sur cellules T de la lignée JURKAT. Cependant, une grande variabilité d'enrichissement entre les expériences de MeDIP est observée.

## **b. Expérimentation animale**

Les souris étaient âgées de 7 semaines au début de l'expérimentation. Aucune différence dans la prise de poids n'a été observée des groupes Csa, TAC et contrôle. Elles pesaient environ 20g à J1 puis entre 26 et 30g à J83 pour l'ensemble des souris (valeurs cohérentes avec les informations du fournisseur). Il n'a pas été observé de différences comportementales particulières au sein des groupes.

Quatre souris sont mortes durant l'expérimentation : deux d'entre elles appartenaient au groupe « 63jours », une du groupe CsA probablement suite à une infection, une du groupe TAC après injection de l'anesthésique ; deux appartenaient au groupe « 83 jours », une du groupe CsA probablement suite à une infection, une du groupe contrôle lors d'une injection intrapéritonéale.

### c. Validation du MeDIP par qPCR

Les analyses par qPCR après amplification de la banque génomique montrent un enrichissement important au niveau du promoteur de *Tsh2b* et une absence d'enrichissement au niveau du promoteur de *Gapdh*, validant ainsi l'étape d'immunoprécipitation avant d'effectuer le séquençage (Figure 17).

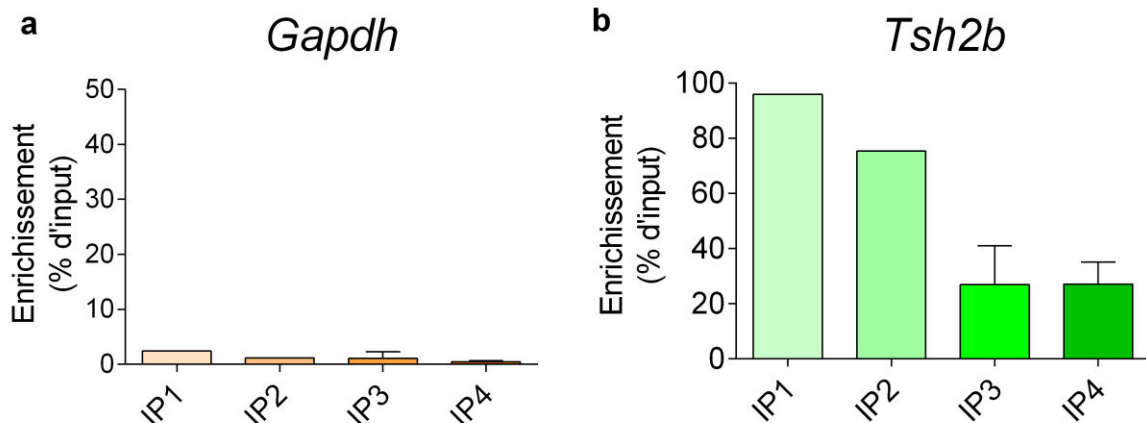


Figure 17. Enrichissement de la méthylation de l'ADN, exprimé en % d'input (fraction d'ADN non immunoprécipité) des LT CD4 au niveau (a) du promoteur de *Gapdh* (région contrôle hypométhylée) et (b) du promoteur de *Tsh2b* (région contrôle hyperméthylée).

### d. Analyse bio-informatique

Les analyses bio-informatiques sont en cours de réalisation. A ce jour, les échantillons du groupe « 83 jours » traités par TAC et les échantillons contrôles (Ctrl) correspondants ont été analysés, correspondant aux fichiers de séquençage suivants :

- Ctrl83, réplicat 1 (Ctrl1): 19
- Ctrl83, réplicat 2 (Ctrl2): 20
- TAC83, réplicat 1 (TAC1): 24
- TAC83, réplicat 2 (TAC2): 23
- TAC83, réplicat 3 (TAC3): 25

i. *Qualité du séquençage*

Les rapports de qualité FASTQC sont donnés en annexe 3. Ils montrent des séquences de bonnes qualités pour les 5 échantillons qui sont donc utilisables pour l'analyse.

- *Per base sequence quality* : la moyenne du score qualité de lecture des bases se situe entre 20 et 30, ce qui représente une lecture de bonne qualité pour des reads générés par l'Ion Proton.
- *Per base sequence content* : les courbes pour chaque base A, T, C, G sont parallèles entre elles jusqu'à environ 200 bases de lecture, correspondant à la taille moyenne des séquences lues. Cela signifie que la qualité de lecture est homogène entre les bases.
- *Per sequence CG content* : la distribution des CG ne respecte pas la distribution théorique du génome *mus musculus* et est plus élevée pour les échantillons Ctrl2, TAC1 et TAC3. Cela s'explique par l'expérimentation MeDIP, responsable d'un enrichissement en fragments méthylés et donc riches en CG.
- *Sequence length distribution* : la distribution de la longueur des reads pour l'échantillon Ctrl1 montre un nombre important de petits reads lus, comparé à la longueur moyenne des fragments d'ADN fournis au séquenceur. Les autres échantillons contiennent une majorité de fragments correspondant à la taille des fragments d'ADN de la banque (entre 170 et 200pb).
- L'analyse des duplicats ne montre pas de biais d'amplification PCR (*sequence duplicat level*).
- Il n'y a pas de région surreprésentée pour ces 5 échantillons.
- L'analyse des Kmer recherche la distribution de petites séquences ATCG sur l'ensemble des *reads* générés. Ces séquences peuvent être surreprésentées dans le génome mais doivent être réparties de façon similaire sur toute la longueur des reads. Le module Kmer de Fastqc teste cette répartition et représente les 6 séquences ayant le plus fort niveau de déviation. Certaines de ces séquences sont fréquemment retrouvées après environ 250 bases lues pour les 5 librairies et peuvent être dues aux augmentations d'erreurs faites par le séquenceur en fin de lecture. Cependant, ils ne perturbent pas l'analyse du signal du fait que la grande majorité des reads est inférieure à 250 bases.



## ii. Analyse différentielle de la méthylation

Il est retrouvé un enrichissement important et de niveau similaire pour l'ensemble des échantillons Ctrl et TAC du groupe « 83 jours » au niveau d'une DMR localisée dans le promoteur de *Meg3*, gène codant pour un ARN long non codant (*lncRNA*) et dont la région génomique (cluster *Dlk1-Dio3*) est soumise à empreinte. Cette « Ig DMR » (*Intergenic Differentiated Methylated Region*) est très méthylée au niveau de l'allèle paternel et permet de contrôler l'expression du *lncRNA* exclusivement par l'allèle maternel (83). C'est une bonne région contrôle car du fait de son implication dans le développement embryonnaire, cette méthylation est hautement conservée. Ainsi, l'enrichissement retrouvé pour l'ensemble de nos échantillons permet de s'assurer du bon fonctionnement de l'étape d'immunoprécipitation(Figure 18).

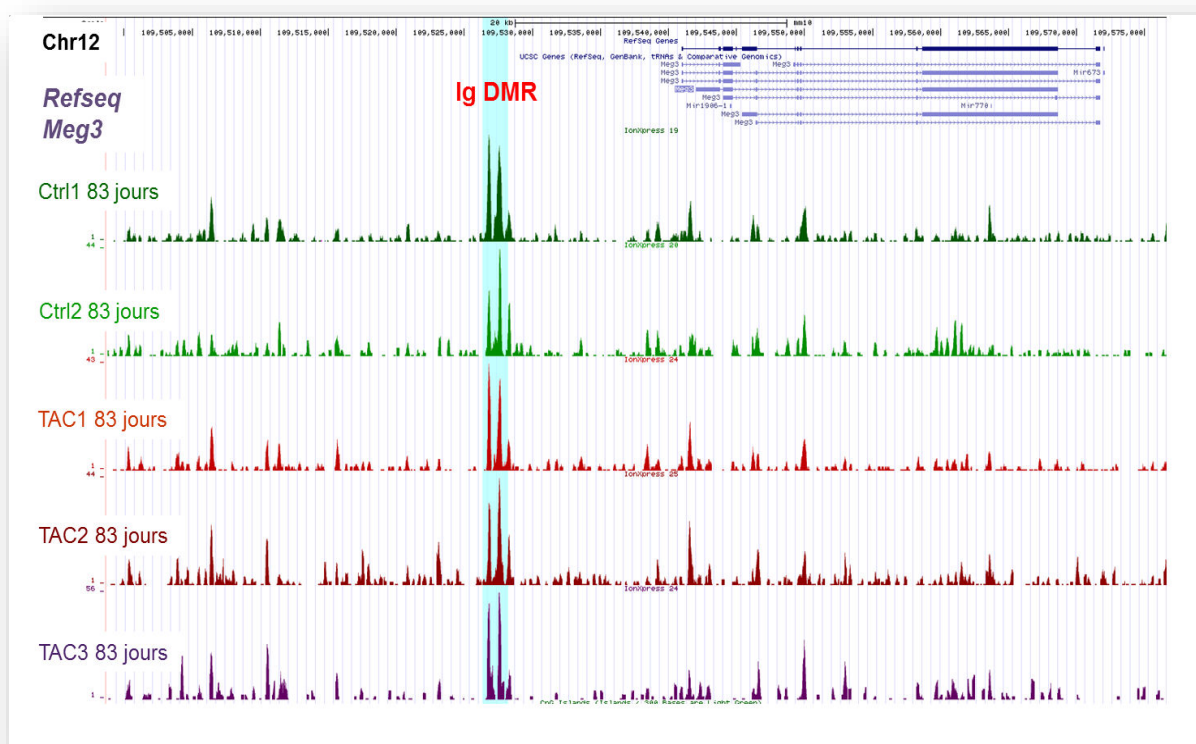


Figure 18. Visualisation de l'Ig DMR dans le cluster *Dlk1-Dio3* et les profils de méthylation des échantillons TAC et Ctrl 83 jours, alignés sur la séquence de référence du gène (Refseq) (mm10) ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)). La région surlignée en bleu correspond à l'Ig DMR.

Afin de comparer les enrichissements globaux des 5 échantillons comparés, une analyse de corrélation a été effectuée sur les *counts* (reads présents sous les pics identifiés). Celle-ci ne montre pas de corrélation particulière entre les échantillons TAC et Ctrl (Figure 19). De plus, la fonction analyse n'a pas détecté de régions avec différences significatives de méthylation.

Une analyse en composant principal (PCA) a donc été menée pour s'assurer de l'absence de valeurs aberrantes ou d'échantillon problématique (*outlier*). Cette analyse identifie les facteurs expliquant au mieux la variabilité entre les échantillons. Le graphe PCA représente les échantillons selon les 2 variables les plus importantes, sur l'axe des abscisses et des ordonnées. L'analyse en PCA des *counts* révèle une très grande variabilité entre l'échantillon 24 (TAC1) et le reste des échantillons (Figure 20).

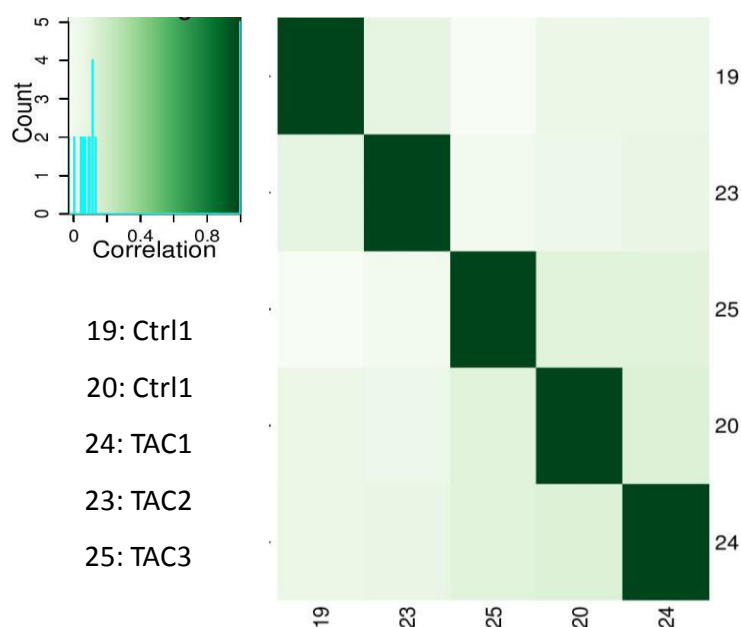


Figure 19. Graphe de corrélation des *counts* (tous les échantillons du groupe TAC et Ctrl, 83 jours)

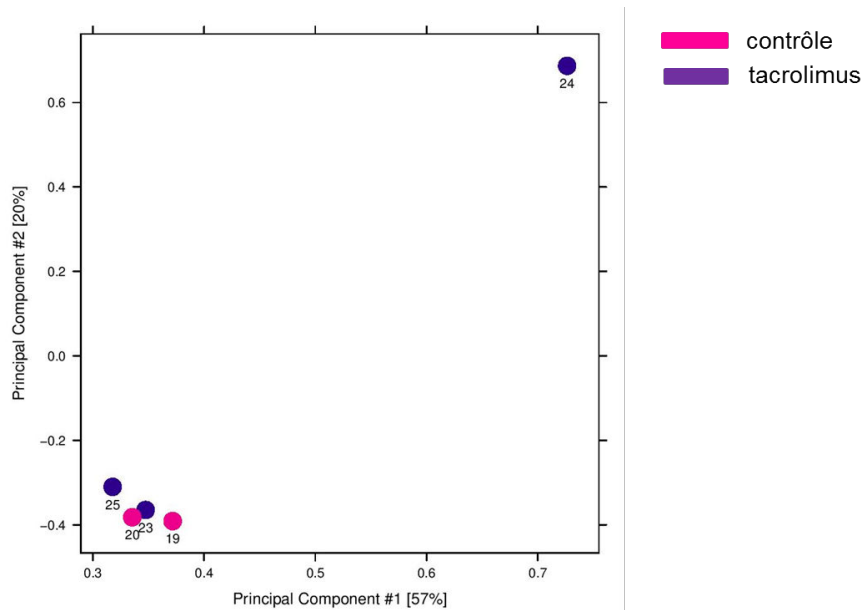


Figure 20. Analyse en composant principal des *counts* (tous les échantillons du groupe TAC et Ctrl, 83 jours)

Du fait de la variabilité anormale retrouvée pour l'échantillon TAC1 (fichier 24), celui-ci a été exclu pour la suite des analyses et considéré comme un *outlier*.

L'exclusion de l'échantillon TAC1 n'a pas augmenté la corrélation dans la distribution des counts entre les échantillons du groupe TAC et du groupe CTRL (Figure 21). Cependant, la fonction analyse a détecté des régions avec des différences significatives de méthylation.



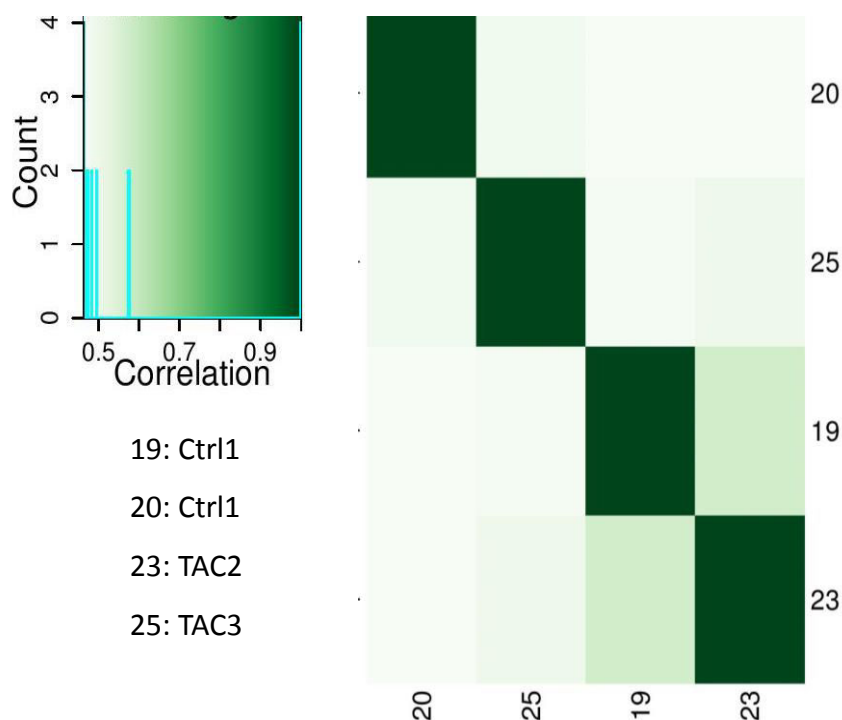


Figure 21. Graphe de corrélation des *counts* (après exclusion du TAC1, numéro 24)

Vingt-quatre régions génomiques ont été identifiées comme présentant des différences significatives de méthylation avec un  $FDR < 0,1$ , entre le groupe TAC et le groupe CTRL. Six sont localisées dans des régions connues du génome. Neuf DMR sont dans des pseudo-gènes, c'est-à-dire des gènes dont la séquence a été décrite et contient les éléments suffisants pour être fonctionnelle, mais ne correspond à aucune protéine connue. Enfin, cinq régions sont situées dans des régions non décrites du génome (Tableau 4).

En particulier, une DMR a été identifiée dans le promoteur distal du gène *Calm2*, codant pour la calmoduline 2, localisée à environ 2kbp du 1<sup>er</sup> exon. Les LT CD4 exposés au TAC durant 83 jours ont un niveau de méthylation plus élevé que les LT CD4 contrôles au niveau de ce promoteur ( $FDR=0,096$ ) (Figure 22).

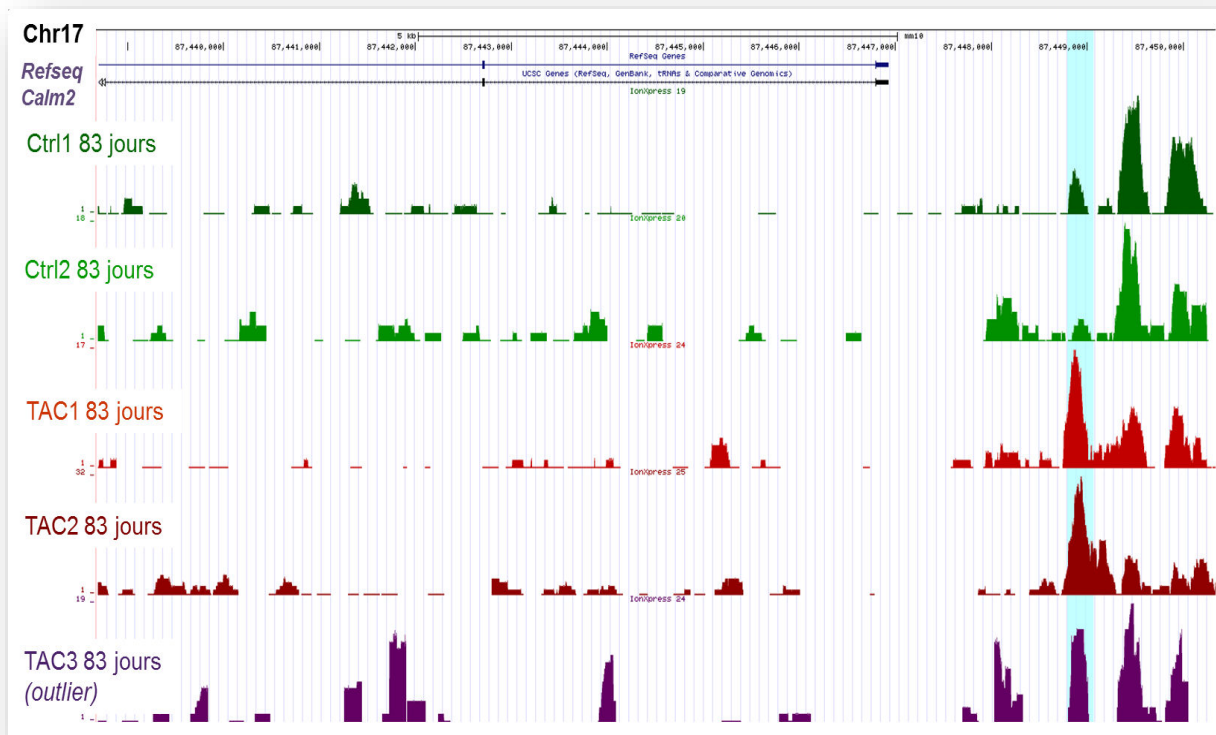


Figure 22. Visualisation du promoteur de *Calm2* et des profils de méthylation des échantillons TAC et Ctrl 83 jours, alignés sur la séquence de référence du gène (Refseq) (mm10) ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)). La région surlignée en bleu correspond à la DMR identifiée.

Une autre région identifiée comme hyperméthylée après exposition au TAC *versus* Ctrl est localisée dans le corps du gène d'*Ilrb12*, codant pour le récepteur à l'IL12, dans un exon commun à tous les transcrits décrits. Cependant, les données visualisées sur UCSC révèlent une importante différence entre les enrichissements des deux échantillons Ctrl, suggérant un artefact dans le signal ou une possible contamination cellulaire (Figure 23).

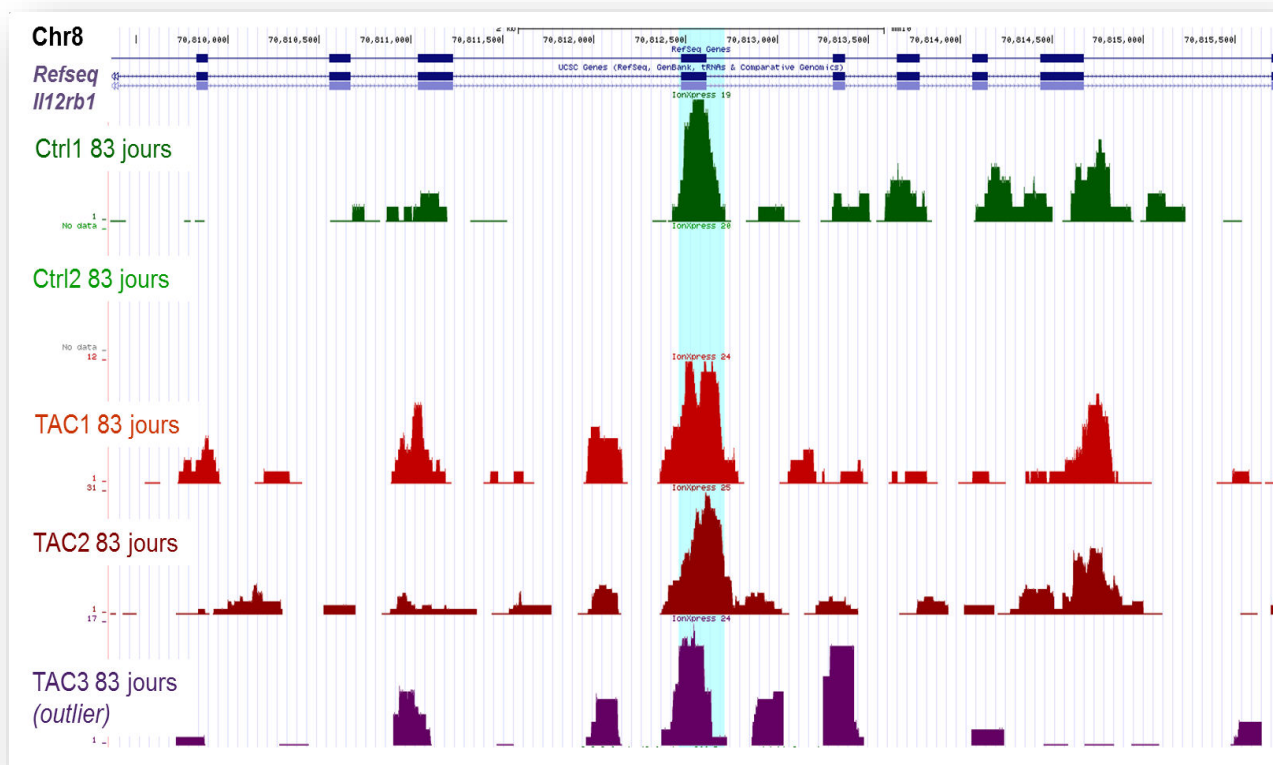


Figure 23. Visualisation UCSC du gène *Il12rb1* ([genome.ucsc.edu/](http://genome.ucsc.edu/)).

D'autres DMR ont été identifiées dans des gènes sans lien direct avec la régulation du système immunitaire (visualisation UCSC en annexe).

Les locus identifiés comme sujets à des variations de la méthylation de l'ADN des LT murins ou humains (Tableau 2) ont été explorés sur UCSC. En particulier, aucune variation de la méthylation de l'ADN n'a été observée dans les promoteurs d'*Il2*, *Il4*, *Csf2* (codant pour GM-CSF), et *Ifng* (visualisation des 4 régions données en annexe à titre d'exemple).

L'analyse en composant principal concentrée sur les régions avec des différences significatives ( $FDR < 0,05$ ) montre que la part de la variabilité expliquée par le traitement entre les échantillons est de 14%. Une variabilité majoritaire de 85% non expliquée est observée entre les groupes TAC et Ctrl (Figure 24).



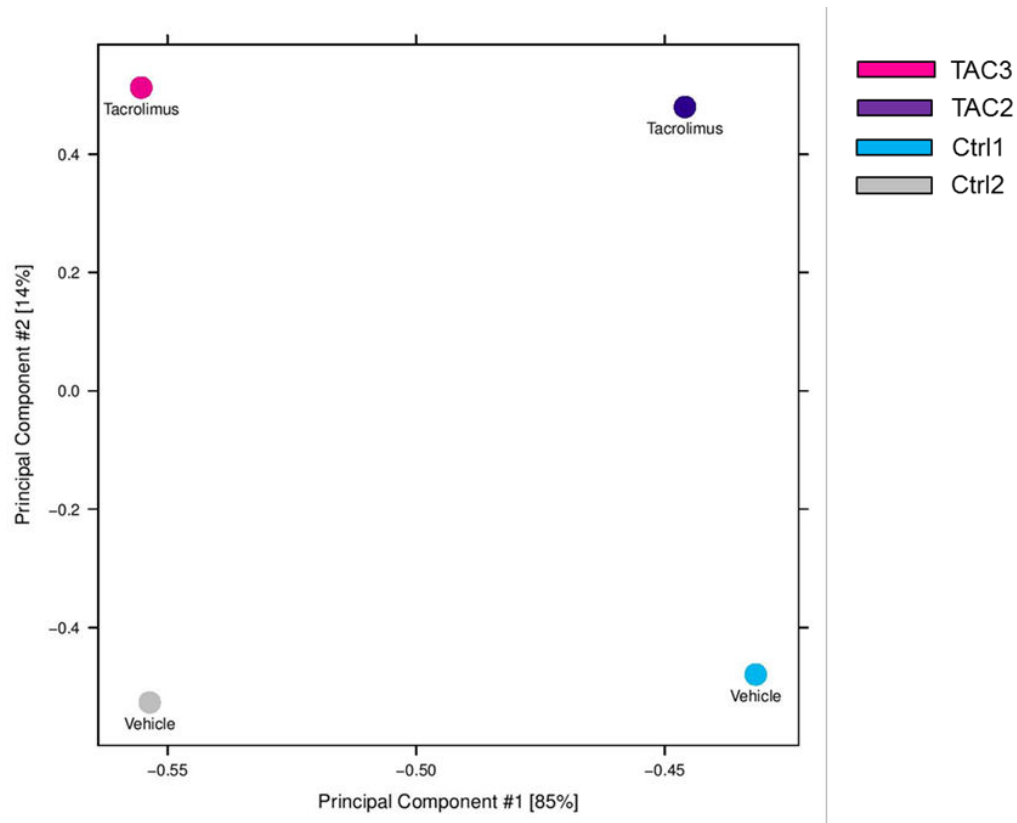


Figure 24. Analyse en composant principal réalisée sur les *counts* couvrant des DMRs identifiées (après exclusion de l'échantillon TAC, numéro 24)

Tableau 4. Liste des DMRs identifiées (avec un FDR<0,1) dans l'analyse des échantillons issus du groupe TAC, 83jours

Chrom	Genes	Localisa- tion	Protéine	Fonction	Début	Fin	Long.	Moyenne	TAC	Ctrl	Log2fc	Petit p	FDR
chr17	<i>Calm2</i>	upstream	Calmoduline	Voie de la calcineurine	87448786	87449217	432	4.48	5.18	3.06	2.12	3.33E-05	0.096
chr8	<i>Vps37a</i>	intron	Protéine « vacuolar sorting 37A »	Complexe endosomal (transport)	40538358	40538771	414	3.55	4.37	1.42	2.95	1.76E-05	0.071
chr8	<i>Il12rb1</i>	exon	Récepteur beta 1 de l'interleukine 12	Stimulation des LT différenciation en Th1	70812461	70812711	251	4.04	4.80	2.33	2.47	1.79E-05	0.071
chr17	<i>Ddx11</i>	intron	ARN Helicase ATP-dépendante	Structure secondaire des ARN	66126388	66126580	193	3.36	4.20	1.08	3.12	9.10E-06	0.062
chr13	<i>Atxn1</i>	intron	Ataxin 1	Rôle dans l'ataxie spinocerebellaire	45917293	45917637	345	4.17	2.67	4.90	-2.23	2.82E-05	0.086
chr13	<i>Pou6f2</i>	intron	POU class 6 homeobox 2	Régulateur de la transcription rôle de supprimeur de tumeur	18193215	18193449	235	3.66	1.79	4.45	-2.66	3.76E-05	0.096
chr9	<i>gm26870</i>	promoteur	pseudo-gène		3035711	3036584	874	8.86	9.58	7.34	2.24	2.71E-05	0.086
chr9	<i>gm26870</i>	promoteur	pseudo-gène		2999948	3000360	413	5.61	6.29	4.31	1.97	1.29E-05	0.071
Y	retro- <i>gm20854</i>	promoteur	pseudo-gène		4161713	4162029	317	4.83	5.51	3.52	1.99	2.16E-05	0.074
chr13	<i>22104081</i> <i>21Rik</i>	intron	pseudo-gène		77438843	77439175	333	4.54	5.36	2.49	2.87	6.07E-07	0.009
chr5					44949540	44949910	371	7.65	8.42	5.89	2.54	1.38E-07	0.004
X					169980838	169981187	350	4.62	2.92	5.38	-2.47	2.83E-06	0.025
chr14	<i>gm21738</i>	exon-intron	pseudo-gène		19417560	19418964	1405	9.28	9.91	8.14	1.76	1.60E-05	0.071
Y					4453414	4453803	390	8.35	9.04	6.98	2.06	1.72E-05	0.071
chr2	<i>gm10801</i>	exon-intron	pseudo-gène		98663742	98664089	348	7.76	8.38	6.63	1.75	1.74E-05	0.071
chr14	<i>gm21738</i>	exon-intron	pseudo-gène		19415654	19416852	1199	8.93	9.54	7.86	1.68	2.19E-05	0.074
chr9	<i>gm26870</i>	intron	pseudo-gène		3022066	3022364	299	5.28	5.94	4.03	1.90	2.71E-05	0.086
chr5					17931503	17931716	214	3.20	4.03	1.04	2.99	3.49E-05	0.096
chr9	<i>gm11168</i>	exon-intron	pseudo-gène		3004697	3005009	313	5.75	6.40	4.54	1.86	3.68E-05	0.096

### 3. Discussion

A partir du constat clinique que les traitements immunosuppresseurs présentent des différences d'efficacité entre les patients transplantés, nous avons émis l'hypothèse qu'une modification de l'activité de la voie de la calcineurine au sein des cellules cibles pourrait expliquer en partie cette variabilité pharmacodynamique. Du fait de leur adaptation rapide pour induire une réponse immunitaire efficace, les cellules T présentent une grande plasticité dans l'expression génique, contrôlée par des régulations épigénétiques. Une vue globale de la potentielle influence des ICN sur cette régulation était donc le point de départ du travail. La méthylation de l'ADN sur le LT CD4 a été choisie, d'une part du fait des connaissances déjà établies sur son rôle dans la régulation d'expression génique, d'autre part, pour envisager des applications cliniques ultérieures.

L'étude a tout d'abord été menée sur la lignée cellulaire JURKAT afin de tester la méthode MeDIP. Nous n'avons pas montré que l'exposition des cellules à la CsA ou au TAC induisait des modifications de la méthylation au niveau du promoteur d'*IL2*. Cependant, nous ne concluons pas sur l'absence d'effet des ICN. En effet, l'étude par qPCR était limitée et a permis d'explorer une région d'environ 100 pb. Il aurait fallu couvrir une région plus grande (à l'aide de plusieurs essais repartis sur le promoteur par exemple) pour effectuer une exploration correcte. Une autre limite de ce travail était le choix du modèle. Issues de cellules cancéreuses présentant un profil épigénétique altéré, les cellules JURKAT étaient susceptibles de répondre différemment en comparaison avec des cellules T physiologiques. L'étude de variation épigénétique via une lignée cellulaire immortalisée n'est pas idéale dans ce contexte (84). L'étude de l'influence des ICN sur les LT est plus pertinente dans un environnement biologique complexe, attendu dans un modèle animal. Cependant, ce travail avait pour objectif premier de tester la MeDIP sur nos cellules d'intérêt et a permis de disposer de matériel biologique en quantité suffisante pour la mise au point de la méthode.

Nous avons observé une grande variabilité d'enrichissement dans les régions contrôles, d'une part entre les qPCR réalisées au sein du modèle cellulaire, et d'autre part, entre les deux types cellulaires testés (JURKAT, Figure 16, p.96 *versus* LT CD4 murins, Figure 17, p.98). L'ensemble du protocole MeDIP a été révisé lors du transfert de la méthode sur les LT CD4 murins, notamment du fait d'un changement de sonicateur entre les 2 études (acquisition d'un sonicateur Bioruptor PICO, Diagenode au sein de la plateforme Genolim



pour l'étude sur modèle murin). Le changement d'un paramètre du MeDIP peut modifier grandement le rendement de l'enrichissement, et cette grande variabilité analytique rend difficile le transfert de la méthode, malgré l'origine commune des JURKAT et LT CD4. La mise au point des méthodes d'analyse des marques épigénétiques doit être effectuée sur le matériel biologique et à l'aide des mêmes outils d'analyse destinés à l'étude principale.

L'analyse différentielle de la méthylation étant en cours de réalisation, les résultats présentés dans ce manuscrit sont préliminaires mais prometteurs. Sur l'ensemble du génome, nous avons montré que seulement 24 régions présentaient un niveau de méthylation modifié après 83 jours d'exposition au TAC. Le promoteur du gène *Calm2*, codant pour l'isoforme 2 de la calmoduline, semble être davantage méthylé après l'exposition au médicament. Ce signal doit être confirmé d'une part, à l'aide d'une méthode d'analyse de la méthylation ciblée sur cette région. Une analyse PCR après traitement par bisulfite de sodium serait adaptée ici. D'autre part, une étude d'expression du gène *Calm2* doit être réalisée pour évaluer l'impact de cette hyperméthylation sur l'expression du gène. Une corrélation entre la modification de la méthylation et l'expression permettra de confirmer ou d'infirmer ce résultat. Une étude du transcriptome sur puce est en cours.

Les résultats obtenus doivent être interprétés avec prudence. Premièrement, nous n'avons pas montré de corrélation au sein des échantillons du groupe TAC et au sein du groupe Ctrl, avant ou après exclusion de l'échantillon TAC1 (Figure 19 p.101, Figure 21 p.103). Ceci peut s'expliquer par le fait que la corrélation a été mesurée sur la distribution globale des *reads* entre les échantillons. Nous pouvons supposer que l'exposition à un médicament entraîne des modifications ciblées de certaines régions du génome. L'effet serait ainsi noyé dans une comparaison globale de l'enrichissement. Deuxièmement, l'analyse en PCA a révélé une variabilité anormalement grande au sein des échantillons du groupe TAC (Figure 20 p.102). Nous avons choisi d'exclure TAC1 du fait de la grande différence observée avec les autres échantillons. Cependant, les profils de méthylation globaux, et spécifiques au niveau de la région contrôle Meg3, sont similaires entre les 3 échantillons TAC, ne montrant pas d'anomalie d'enrichissement pour TAC1 ; l'analyse qualité des fichiers de séquençage ne met pas non plus en évidence d'anomalie particulière au niveau du séquençage concernant cet échantillon. Ainsi, le choix d'exclure l'échantillon TAC1 est critiquable. Une explication possible à l'observation de cette différence est une contamination avec un autre type cellulaire lors de l'isolement des LT CD4 (malgré le contrôle effectué par cytométrie de flux). La

méthylation de l'ADN étant spécifique du type cellulaire, une contamination par des LT CD8 ou d'autres leucocytes pourrait avoir gommé la signature médicamenteuse. L'analyse du transcriptome suivie d'une comparaison des profils d'expression avec des données provenant d'autres types leucocytaires murins pourrait répondre à la question. Le consortium ENCODE met à disposition des données d'expression du génome sur un nombre important de types cellulaires murins ([www.encodeproject.org](http://www.encodeproject.org)). Avec l'utilisation de la puce Illumina Infinium 450K (analyse du méthylome après traitement par bisulfite, cf. Chapitre 1 p.18-20), Reinius et col. montre la spécificité de méthylation pour les différents type leucocytaires de prélèvements sanguins périphériques issus de volontaires sains (85). Cette résolution d'analyse permet de décrire et de quantifier des sous populations dans un échantillon d'étude. Sans toutefois répondre à notre question de départ, cette analyse permettrait d'écarter les risques de contamination cellulaire, et de renforcer la robustesse des résultats observés.

Cette variabilité importante entre échantillons met en avant une autre limite de l'étude. Le choix de 3 réplicats par conditions testées était un nombre insuffisant. La mortalité obtenue dans certains groupes, ainsi que l'importante différence de réponse observée pour les échantillons TAC « 83 jours » permettent de tirer la conclusion qu'un nombre plus important de réplicats était nécessaire. Cinq réplicats par groupe pourraient être recommandés pour les futures analyses réalisées dans le projet.

Comme discuté dans le chapitre 1, il existe de nombreuses autres voies de régulation de l'expression génique, en complément de la méthylation de l'ADN : marques histones, ARN non codants, facteurs de transcription, etc. L'étude de la méthylation de l'ADN de façon isolée ne représente qu'une infime partie de l'influence des ICN. Il est possible que certains loci, dont l'expression est effectivement modifiée par l'action des ICN, n'aient pas été identifiés ici. En étudiant l'impact de l'acide mycophénolique (MPA) au sein des LT CD4, issus de volontaires sains d'une part, et de patients atteints de lupus d'autre part (LT CD4 lupus), Yang et col. ne montrent pas de modification de la méthylation de l'ADN alors qu'une augmentation de l'acétylation de l'histone 3 est observée spécifiquement chez les LT CD4 lupus. Ils ont ensuite montré que l'exposition du MPA en *ex-vivo* sur les LT CD4 lupus diminuait l'activité des HDAC et augmentaient celle des HAC, expliquant probablement une partie du mode d'action du MPA du fait de l'hypoacétylation globalement observée chez les patients atteints de la maladie (86). L'étude en parallèle des sites de régulation par la DNase, des principales marques histones identifiés dans la régulation transcriptionnelle type

acétylation/méthylation des H3/H4, des transcripts puis l'intégration de l'ensemble de ces données pourraient identifier précisément les loci responsables d'une modification d'activité du génome induite par l'exposition aux ICN. Cette première étape sans *a priori* et de grande ampleur est nécessaire pour avoir une première image de l'action médicamenteuse sur la régulation épigénétique. Nous pourrions ensuite analyser chaque loci/marque identifié de façon plus précise pour comprendre la réelle action des ICN. Jamais réalisée jusqu'alors, cette étude de la méthylation de l'ADN est donc être le début d'une large investigation pharmacodynamique des ICN.



## C. Perspectives

Les ICN induisent-ils des changements dans la régulation épigénétique des LT CD4 permettant d'expliquer des différences d'activité cellulaire ?

L'objectif final étant d'identifier des biomarqueurs épigénétiques capables de prédire un phénotype clinique chez le patient transplanté, il est important de définir précisément le phénotype d'étude pour la suite du travail. Dans notre étude, nous identifions des régions présentant des différences de méthylation sans lien avec un phénotype particulier. Ce travail, exploratoire, avait pour but de savoir si les ICN avaient une potentielle influence à ce niveau de l'expression des gènes ou non. Ainsi, la population de LT CD4 a été étudiée dans son ensemble, sans souci de distinction de fonctionnement cellulaire.

Pour la suite du projet, les travaux sur modèle animal doivent être poursuivis, avec une classification de nos cellules d'intérêt selon un phénotype. En travaillant sur des sous-populations filtrées selon un critère fonctionnel, nous pourrions associer des modifications de la méthylation au dysfonctionnement du LT. A titre d'exemples, la mesure de l'activité ATP (87), ou celle de l'activité calcineurine, ou de l'expression des gènes NFAT dépendants, pourrait être utilisée pour séparer les LT CD4 avant l'étape d'immunoprécipitation. La comparaison des niveaux de méthylation entre les sous-groupes cellulaires « bon répondeurs » et « mauvais répondeurs » au traitement permettrait d'identifier des biomarqueurs intéressants.

Les données générées par cette première étude n'ont pas fini d'être analysées. Tout d'abord, les résultats obtenus pour les échantillons traités par tacrolimus des groupes « 28 jours » et « 63 jours » seront comparés au groupe « 83 jours ». Cela apportera des informations sur la dynamique des modifications épigénétiques observées. Ensuite, les analyses bio-informatiques doivent être étendues aux échantillons des groupes « ciclosporine ». La comparaison des résultats issus des études « tacrolimus » *versus* « ciclosporine » pourra expliquer des différences dans leurs mécanismes d'action. Les analyses des données générées par le séquençage NGS demandent une réelle maîtrise des outils bio-informatiques. Ces nouvelles technologies se sont rapidement développées et intégrées aux travaux de recherche scientifique ; cependant, les analyses bio-informatiques permettant leurs interprétations sont difficilement réalisables sans les compétences d'un bio-

informaticien. Une utilisation non maîtrisée de ces outils peut facilement mener à des résultats faussement positifs (ou négatifs). Des bonnes pratiques de retraitement de données NGS dans un contexte clinique sont actuellement proposées par des groupes experts (88). Ainsi, acquérir les compétences nécessaires à ces analyses ou établir une collaboration avec une équipe spécialisée dans les analyses bio-informatiques de MeDIP-seq est un point crucial pour la bonne réussite d'un tel projet.

# Conclusion générale

Les différents travaux réalisés dans le cadre de cette thèse d'université ont tenté d'explorer la variabilité pharmacodynamique des ICN en transplantation, d'un point de vue pharmacogénétique puis pharmacoépigénétique. L'objectif de ces travaux était, d'une part, d'identifier des biomarqueurs génétiques potentiellement utilisables, à terme, pour améliorer le suivi thérapeutique de ces médicaments, et d'autre part, d'évaluer l'impact des ICN sur la régulation épigénétique.

Basé actuellement sur la mesure des concentrations sanguines chez le patient transplanté, le suivi thérapeutique des ICN est en amélioration continue notamment par l'apport des travaux de recherche en pharmacogénétique. Nous n'avons pas identifié de variants de la voie de la calcineurine permettant de prédire la pharmacodynamie des ICN, que ce soit sur le risque de rejet aigu ou d'infections graves chez les patients transplantés rénaux. Ces résultats de l'étude « POLYCIS » mettent en avant la difficulté d'étudier le rejet aigu en pharmacogénétique aujourd'hui, dont l'incidence est faible du fait de l'optimisation des traitements. Les approches « gènes candidats » restent pertinentes pour l'exploration d'autres phénotypes en transplantation. Les deux travaux de revue de littérature ont permis de sélectionner d'autres variants des gènes codants pour les protéines participant à la pharmacodynamie des ICN non testés dans notre population, et qui mériteraient d'être explorés ultérieurement. En perspective de ces travaux génétiques, notre panel de variants candidats pourrait être étudié dans le développement des NODATs, effet indésirable rapporté avec l'utilisation des ICN et dont la voie de la calcineurine semble impliquée.

La suite de l'exploration de la variabilité pharmacodynamique des ICN a été centrée sur l'épigénétique. La pharmacoépigénétique, étude des variations épigénétiques modulant la réponse à un médicament, ou bien induites par l'exposition à un médicament, est une discipline en plein essor qui viendra probablement compléter la pharmacogénétique dans ses applications. Au travers de l'étude des modifications de méthylation de l'ADN au sein du LT CD4 de souris, nous avons mis au point un protocole de MeDIP-seq pour le séquenceur Ion Proton, enjeu de taille du fait que cette méthode est peu publiée car la majorité des séquenceurs utilisés dans les plateformes de biologie moléculaire sont de type Illumina. Les analyses des données générées par cette méthode sont toujours en cours, cependant, des



résultats préliminaires semblent montrer l'influence potentielle du TAC sur la méthylation d'un gène de la voie de la calcineurine, *Caln2* codant pour la calmoduline 2. Ces résultats sont prometteurs mais devront être confirmés pour comprendre l'impact réel de ces différences de niveau de méthylation. Ce travail exploratoire a permis de tirer quelques leçons sur le développement des analyses épigénétiques : la prise en compte de la grande variabilité technique observée entre expériences, l'effet tissu spécifique nécessitant une pureté élevée des cellules étudiées, le choix du phénotype pour comprendre l'impact biologique des modifications observées, et le retraitement bio-informatique des données NGS qui est un enjeu majeur pour mener à bien les travaux utilisant ces nouvelles technologies NGS.

Du fait de ses variations dynamiques et réversibles, l'épigénétique dans l'exploration des causes de variabilité de réponse aux médicaments est prometteuse. Dans un futur proche, nous pourrions imaginer que des biomarqueurs pharmacoépigénétiques viendront compléter les outils pharmacogénétiques aujourd'hui utilisés en transplantation. L'objectif est d'arriver à combiner un ensemble d'outils de suivi à différents niveaux de la variabilité pharmacodynamique, depuis les modifications de l'ADN jusqu'aux concentrations sanguines des médicaments immunosuppresseurs, afin d'optimiser leur usage et d'améliorer continuellement la prise en charge des patients transplantés.

# Bibliographie

1. Kho M, Cransberg K, Weimar W, van Gelder T. Current immunosuppressive treatment after kidney transplantation. *Expert Opin Pharmacother*. 2011 Jun;12(8):1217–31.
2. Luveniq (voclosporin) FDA Approval Status - Drugs.com [Internet]. [cited 2016 Feb 9]. Available from: <http://www.drugs.com/history/luveniq.html>
3. Heemann U, Abramowicz D, Spasovski G, Vanholder R, European Renal Best Practice Work Group on Kidney Transplantation. Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: a European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc*. 2011 Jul;26(7):2099–106.
4. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80(4):1483–521.
5. Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jun;5(6):472–84.
6. Ke H, Huai Q. Structures of calcineurin and its complexes with immunophilins-immunosuppressants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 28;311(4):1095–102.
7. Pouché L, Stojanova J, Marquet P, Picard N. New challenges and promises in solid organ transplantation pharmacogenetics: the genetic variability of proteins involved in the pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Pharmacogenomics*. 2016 Feb;17(3):277–96.
8. Base de données publique des médicaments- ANSM [Internet]. Available from: <http://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/>
9. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2009 Feb;4(2):481–508.
10. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. 2014 Feb;14(2):272–83.
11. Sigdel TK, Ng YW, Lee S, Nicora CD, Qian W-J, Smith RD, et al. Perturbations in the urinary exosome in transplant rejection. *Front Med*. 2014;1:57.
12. Collège de la Haute Autorité de Santé. Suivi ambulatoire de l'adulte transplanté rénal au-delà de 3 mois après transplantation - RECOMMANDATIONS. HAS; 2007 Nov.
13. Saint-Marcoux F, Marquet P, Rousseau A. Pharmacocinétique et suivi thérapeutique pharmacologique de la ciclosporine en transplantation d'organes solides. [Limoges]: S.C.D. de l'Université; 2004.

14. Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, et al. Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit.* 2009 Apr;31(2):139–52.
15. Ting LSL, Villeneuve E, Ensom MHH. Beyond cyclosporine: a systematic review of limited sampling strategies for other immunosuppressants. *Ther Drug Monit.* 2006 Jun;28(3):419–30.
16. Agence de la biomédecine, Haute Autorité de Santé. Règles de bonnes pratiques en génétique constitutionnelle à des fins médicales (Hors diagnostic prénatal). 2012 Décembre.
17. Picard N, Bergan S, Marquet P, van Gelder T, Wallemacq P, Hesselink DA, et al. Pharmacogenetic biomarkers predictive of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. *Ther Drug Monit.* 2015 Oct 13;
18. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Bosó V, Reig J, Poveda JL, et al. Effect of CYP3A5\*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J.* 2015 Feb;15(1):38–48.
19. Barry A, Levine M. A systematic review of the effect of CYP3A5 genotype on the apparent oral clearance of tacrolimus in renal transplant recipients. *Ther Drug Monit.* 2010 Dec;32(6):708–14.
20. Thervet E, Lorient MA, Barbier S, Buchler M, Ficheux M, Choukroun G, et al. Optimization of initial tacrolimus dose using pharmacogenetic testing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010 Jun;87(6):721–6.
21. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 Jul;98(1):19–24.
22. de Jonge H, Elens L, de Loo H, van Schaik RH, Kuypers DRJ. The CYP3A4\*22 C>T single nucleotide polymorphism is associated with reduced midazolam and tacrolimus clearance in stable renal allograft recipients. *Pharmacogenomics J.* 2015 Apr;15(2):144–52.
23. Moes DJ a. R, Swen JJ, den Hartigh J, van der Straaten T, van der Heide JJH, Sanders JS, et al. Effect of CYP3A4\*22, CYP3A5\*3, and CYP3A Combined Genotypes on Cyclosporine, Everolimus, and Tacrolimus Pharmacokinetics in Renal Transplantation. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol.* 2014;3:e100.
24. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RHN. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics.* 2013 Jan;14(1):47–62.
25. Yano I. Pharmacodynamic monitoring of calcineurin phosphatase activity in transplant patients treated with calcineurin inhibitors. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(3):150–7.



26. Caruso R, Perico N, Cattaneo D, Piccinini G, Bonazzola S, Remuzzi G, et al. Whole-blood calcineurin activity is not predicted by cyclosporine blood concentration in renal transplant recipients. *Clin Chem*. 2001 Sep;47(9):1679–87.
27. Sommerer C, Giese T. NFAT-regulated gene expression as predictive biomarker of personal response to calcineurin inhibitors. *Ther Drug Monit*. 2015 Aug 8;
28. Sommerer C, Schnitzler P, Meuer S, Zeier M, Giese T. Pharmacodynamic monitoring of cyclosporin A reveals risk of opportunistic infections and malignancies in renal transplant recipients 65 years and older. *Ther Drug Monit*. 2011 Dec;33(6):694–8.
29. Heard E, Khochbin S. Epigénétique : comment se joue la partition du génome ? *Science&Santé*. 2012 Nov;(11):23–33.
30. Lacoste N, Coté J. Le code épigénétique des histones. *Médecine Sci*. 2003 Oct;19(10):955–9.
31. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, et al. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*. 2007 May 18;129(4):823–37.
32. Blewitt M. Epigenetic Control of Gene Expression [Internet]. University of Melbourne; 2014. Available from: <https://class.coursera.org/epigenetics>
33. Nestor CE, Reddington JP, Benson M, Meehan RR. Investigating 5-hydroxymethylcytosine (5hmC): the state of the art. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1094:243–58.
34. Vinson C, Chatterjee R. CG methylation. *Epigenomics*. 2012 Dec;4(6):655–63.
35. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):321–6.
36. Thurman RE, Rynes E, Humbert R, Vierstra J, Maurano MT, Haugen E, et al. The accessible chromatin landscape of the human genome. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):75–82.
37. Shen L, Zhang Y. 5-Hydroxymethylcytosine: generation, fate, and genomic distribution. *Curr Opin Cell Biol*. 2013 Jun;25(3):289–96.
38. Thomson JP, Lempiäinen H, Hackett JA, Nestor CE, Müller A, Bolognani F, et al. Non-genotoxic carcinogen exposure induces defined changes in the 5-hydroxymethylome. *Genome Biol*. 2012;13(10):R93.
39. Espada J, Carrasco E, Calvo MI. Standard DNA methylation analysis in mouse epidermis: bisulfite sequencing, methylation-specific PCR, and 5-methyl-cytosine (5mC) immunological detection. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2014;1094:221–31.
40. Wani K, Aldape KD. PCR Techniques in Characterizing DNA Methylation. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2016;1392:177–86.

41. Janeway CA. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7461–8.
42. Sullivan JA, Adams AB, Burlingham WJ. The emerging role of TH17 cells in organ transplantation. *Transplantation*. 2014 Mar 15;97(5):483–9.
43. Schulz EG, Mariani L, Radbruch A, Höfer T. Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12. *Immunity*. 2009 May;30(5):673–83.
44. Pouché L, Avcu K, Esperón P, Noceti OM, Marquet P, Picard N. Genetic Databases and Their Pitfalls: An Example Related to Pharmacogenetics. *Ther Drug Monit*. 2013 Oct;35(5):713–4.
45. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Feb;20(1):43–59.
46. Stojanova J, Pouché L, Picard N. Genetic polymorphisms in the immune response: A focus on kidney transplantation. *Clin Biochem*. 2015 Jul 11;
47. Smith AJP, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Feb;20(1):43–59.
48. Thakkestian A, Dmitrienko S, Gerbase-DeLima M, McDaniel DO, Inigo P, Chow KM, et al. Association between cytokine gene polymorphisms and outcomes in renal transplantation: a meta-analysis of individual patient data. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Sep 1;23(9):3017–23.
49. Marshall SE, McLaren AJ, McKinney EF, Bird TG, Haldar NA, Bunce M, et al. Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation. *Transplantation*. 2001 Feb 15;71(3):469–76.
50. Wu W, Liu Y, Li S, Hu L, Sun X, Cai L, et al. Association between IL-4 polymorphism and acute rejection of solid organ allograft: a meta-analysis. *Gene*. 2013 Jan 15;513(1):14–21.
51. Ge Y-Z, Wu R, Lu T-Z, Jia R-P, Li M-H, Gao X-F, et al. Combined effects of TGFB1 +869 T/C and +915 G/C polymorphisms on acute rejection risk in solid organ transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*. 2014;9(4):e93938.
52. Pouché L, Koitka M, Stojanova J, Woillard J-B, Monchaud C, Villeneuve C, et al. A candidate gene approach of the calcineurin pathway to identify variants associated with clinical outcomes in renal transplantation. *Pharmacogenomics*. 2016 Mar;17(4):375–91.
53. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2007 Dec 20;357(25):2562–75.
54. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*. 2005 Oct 8;331(7520):810.

55. Elens L, Sombogaard F, Hesselink DA, van Schaik RHN, van Gelder T. Single-nucleotide polymorphisms in P450 oxidoreductase and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  are associated with the development of new-onset diabetes after transplantation in kidney transplant recipients treated with tacrolimus. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Dec;23(12):649–57.
56. Tavira B, Coto E, Díaz-Corte C, Ortega F, Arias M, Torres A, et al. KCNQ1 gene variants and risk of new-onset diabetes in tacrolimus-treated renal-transplanted patients. *Clin Transplant*. 2011 Jun;25(3):E284-291.
57. Chen Y, Sampaio MS, Yang JW, Min D, Hutchinson IV. Genetic polymorphisms of the transcription factor NFATc4 and development of new-onset diabetes after transplantation in Hispanic kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2012 Feb 15;93(3):325–30.
58. Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Precision Medicine and Rare Genetic Variants. *Trends Pharmacol Sci*. 2016 Feb;37(2):85–6.
59. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, et al. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. 2012 Sep 7;337(6099):1190–5.
60. Mai A, Altucci L. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Jan;41(1):199–213.
61. Lötsch J, Schneider G, Reker D, Parnham MJ, Schneider P, Geisslinger G, et al. Common non-epigenetic drugs as epigenetic modulators. *Trends Mol Med*. 2013 Dec;19(12):742–53.
62. Thomson JP, Moggs JG, Wolf CR, Meehan RR. Epigenetic profiles as defined signatures of xenobiotic exposure. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2014 avril;764–765:3–9.
63. Sato K, Fukata H, Kogo Y, Ohgane J, Shiota K, Mori C. Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the mouse uterus. *Endocr J*. 2009;56(1):131–9.
64. Suárez-Álvarez B, Baragaño Raneros A, Ortega F, López-Larrea C. Epigenetic modulation of the immune function: a potential target for tolerance. *Epigenetics*. 2013 Jul;8(7):694–702.
65. Sawalha AH. Epigenetics and T-cell immunity. *Autoimmunity*. 2008 May;41(4):245–52.
66. Lee C-G, Sahoo A, Im S-H. Epigenetic regulation of cytokine gene expression in T lymphocytes. *Yonsei Med J*. 2009 Jun 30;50(3):322–30.
67. Lal G, Bromberg JS. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood*. 2009 Oct 29;114(18):3727–35.



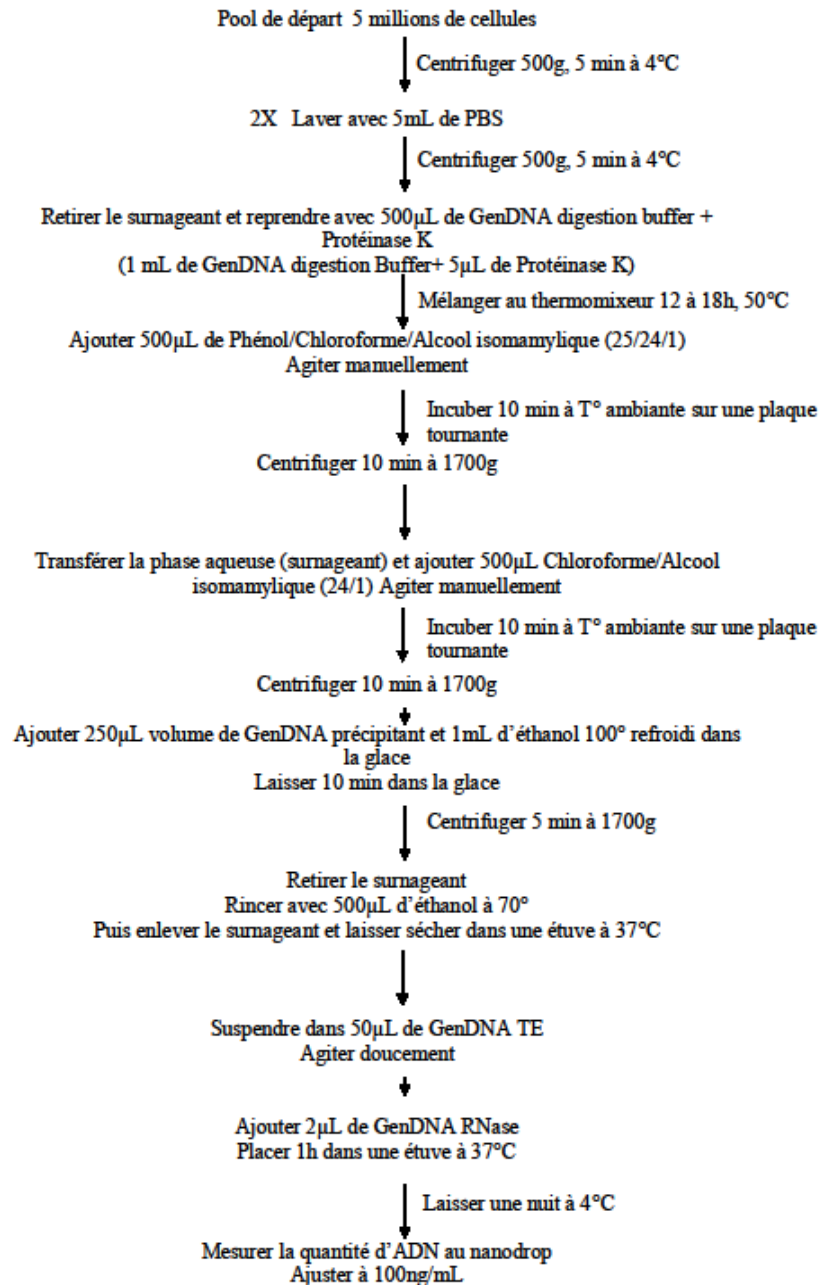
68. Li Y, Ohms SJ, Shannon FM, Sun C, Fan JY. IL-2 and GM-CSF are regulated by DNA demethylation during activation of T cells, B cells and macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 23;419(4):748–53.
69. Falvo JV, Jasenosky LD, Kruidenier L, Goldfeld AE. Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation. *Adv Immunol*. 2013;118:37–128.
70. Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Salvanés R, Muro M, Martínez-Cambor P, Colado E, et al. DNA methylation dynamics in blood after hematopoietic cell transplant. *PloS One*. 2013;8(2):e56931.
71. Mehta TK, Hoque MO, Ugarte R, Rahman MH, Kraus E, Montgomery R, et al. Quantitative detection of promoter hypermethylation as a biomarker of acute kidney injury during transplantation. *Transplant Proc*. 2006 Dec;38(10):3420–6.
72. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 2000 Nov 9;343(19):1350–4.
73. Corley MJ, Zhang W, Zheng X, Lum-Jones A, Maunakea AK. Semiconductor-based sequencing of genome-wide DNA methylation states. *Epigenetics*. 2015;10(2):153–66.
74. Sengenès J. Développement de méthodes de séquençage de seconde génération pour l'analyse des profils de méthylation de l'ADN. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI;
75. Andrews S. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
76. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma Oxf Engl*. 2009 Aug 15;25(16):2078–9.
77. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoutte J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol*. 2008;9(9):R137.
78. Stark R, Brown G. DiffBind: differential binding analysis of ChIP-Seq peak data. Bioconductor [Internet]. 2011. Available from: <http://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/DiffBind/inst/doc/DiffBind.pdf>
79. Ross-Innes CS, Stark R, Teschendorff AE, Holmes KA, Ali HR, Dunning MJ, et al. Differential oestrogen receptor binding is associated with clinical outcome in breast cancer. *Nature*. 2012 Jan 19;481(7381):389–93.
80. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma Oxf Engl*. 2010 Jan 1;26(1):139–40.
81. Robinson MD, Smyth GK. Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostat Oxf Engl*. 2008 Apr;9(2):321–32.

82. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*. 2010 Mar 15;26(6):841–2.
83. Sato S, Yoshida W, Soejima H, Nakabayashi K, Hata K. Methylation dynamics of IG-DMR and Gtl2-DMR during murine embryonic and placental development. *Genomics*. 2011 Aug;98(2):120–7.
84. Michels KB, Binder AM, Dedeurwaerder S, Epstein CB, Grealley JM, Gut I, et al. Recommendations for the design and analysis of epigenome-wide association studies. *Nat Methods*. 2013 Oct;10(10):949–55.
85. Reinus LE, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlén S-E, Greco D, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PloS One*. 2012;7(7):e41361.
86. Yang Y, Tang Q, Zhao M, Liang G, Wu H, Li D, et al. The effect of mycophenolic acid on epigenetic modifications in lupus CD4+T cells. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2015 May;158(1):67–76.
87. Jo Y, Lim J, Kim Y, Han K, Min W-S, Oh E-J. CD4 T-cell function assay using Cylex ImmuKnow and lymphocyte subset recovery following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Immunol*. 2015 Oct;33(2):78–83.
88. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):124–35.

# Table des annexes

Annexe 1.	Protocole d'extraction d'ADN (par phénol/chloroforme/alcool iso amylique) testé dans le développement du MEDIP sur culture cellulaire.....	124
Annexe 2.	Protocole MeDIP-seq.....	125
Annexe 3.	Lignes de commandes.....	133
Annexe 4.	Rapports qualité FASTQC des fichiers de séquençage (groupes TAC et Ctrl « 83jours »)..	134
Annexe 5.	Visualisation des régions géniques identifiées comme DMRs selon l'analyse <i>Diffbind</i> (cf. Tableau 4).	137
Annexe 6.	Visualisation des certains locus précédemment identifiés comme présentant des variations de la méthylation de l'ADN au sein du LT CD4 (cf. Tableau 2) .....	139

## Annexe 1. Protocole d'extraction d'ADN (par phénol/chloroforme/alcool iso amylique) testé dans le développment du MEDIP sur culture cellulaire





## Annexe 2. Protocole MeDIP-seq

### Protocole MeDIP-Seq

#### I. Genomic DNA isolation

##### A. QI Amp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen)

= Extraction ADN génomique

- ✓ Déposer 20µl de protéase au fond de tubes de 1,5ml
- ✓ Ajouter 2.10<sup>6</sup> LT CD4 total dans un volume final de 200µl
- ✓ Ajouter 200µl de tampon AL
- ✓ Vortexer 15 secondes
- ✓ Incuber 10min à 56°C
- ✓ Centrifuger brièvement (pour éliminer les gouttes du bouchon des tubes)
- ✓ Ajouter 200µl d'éthanol (96-100%) dans chaque tube
- ✓ Vortexer 15 secondes et centrifuger brièvement
- ✓ Déposer le contenu des tubes sur les colonnes Qiagen, ne pas mouiller les bords
- ✓ Centrifuger à 8000rpm pendant 1min
- ✓ Placer la colonne dans un nouveau tube de 2ml Qiagen et jeter l'ancien
- ✓ Déposer 500µl de tampon AW1
- ✓ Centrifuger à 8000rpm pendant 1min
- ✓ Placer la colonne dans un nouveau tube de 2ml Qiagen et jeter l'ancien
- ✓ Déposer 500µl de tampon AW2
- ✓ Centrifuger à vitesse maximale pendant 1min
- ✓ Placer la colonne dans un nouveau tube de 2ml Qiagen et jeter l'ancien
- ✓ Centrifuger à nouveau à vitesse maximale 3min
- ✓ Placer la colonne sur un tube de 1,5ml
- ✓ Déposer au centre de la colonne 200µl de tampon AE
- ✓ Attendre 2min puis centrifuger à 8000rpm pendant 1min

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

##### B. Qubit® DNA Assay Kit avec le Qubit® 2.0 Fluorometer (Life technologies™)

= Dosage ADN génomique

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

#### II. Ion Torrent MeDIP-Seq Library Construction

##### C. Bioruptor® Pico (Diagenode)

= Sonication ADN génomique

- ✓ Allumer le sonicateur au moins 20min avant l'utilisation (le temps que l'eau descende à 4°C)
- ✓ Mettre de l'eau distillée dans la cuve
- ✓ Régler à 4°C
- ✓ Préparer 100µl d'échantillon à une concentration de 20ng/µl dans un tube de 0,65ml
- ✓ Régler sur 20 cycles pour obtenir des fragments à 200pb
- ✓ Avec 30s « on » et 30s « off »
- ✓ Après sonication, transférer le mélange dans un tube Eppendorf de 1,5ml

- ✓ Conserver sur glace

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

#### D. End-repair DNA : Ion Plus Fragment Library

= Réparation extrémités de l'ADN fragmenté

NB : Avant utilisation, centrifuger 2 secondes les composants du **Ion plus Fragment Library Kit** afin de les faire redescendre au fond du tube

- ✓ Ajouter de la **Nuclease-free Water** à l'ADN fragmenté pour atteindre le volume total suivant :

100 ng ADN	1µg d'ADN
79µl	158µl

- ✓ Mélanger par pipetage dans un tube Eppendorf de 1,5ml :

Composant	Volume (µl)	
	100ng	1µg
ADN fragmenté	79	158
<b>5X End Repair Buffer</b>	20	40
<b>End Repair Enzyme</b>	1	2
<b>Total</b>	100	200

- ✓ Incuber 20min à température ambiante

#### E. Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter)

= Purification de l'ADN fragmenté

**ATTENTION : Toujours utiliser de l'éthanol à 70% fraîchement préparé (1ml par échantillon + excès) pour les étapes suivantes. Un pourcentage trop élevé d'éthanol pourrait causer un lavage inefficace des petits fragments d'ADN. Un pourcentage trop faible d'éthanol pourrait causer une perte d'échantillon**

- ✓ Ajouter un volume d'**Agencourt AMPure XP Reagent** à l'échantillon (1,8X le volume d'échantillon)

100 ng ADN	1µg d'ADN
180µl	360µl

- ✓ Pipeter 5 fois pour mélanger complètement la suspension de billes avec l'ADN
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Laisser incuber 5min à température ambiante
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Attendre 3min ou jusqu'à ce que la solution soit limpide
- ✓ Enlever soigneusement et jeter le surnageant, sans perturber le culot de billes
- ✓ Ne pas enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Ajouter 500µl d'éthanol 70% fraîchement préparé

- ✓ Incuber 30s
- ✓ Tourner les tubes accrochés sur le **DynaMag™-2** sur eux-mêmes deux fois pour faire bouger les billes autour de la paroi des tubes
- ✓ Attendre que la solution soit limpide
- ✓ Enlever soigneusement et jeter le surnageant, sans perturber le culot de billes
- ✓ Répéter le lavage à l'éthanol 70% une seconde fois
- ✓ Pour enlever l'éthanol résiduel, centrifuger brièvement
- ✓ Remettre les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Enlever doucement le reste du surnageant avec une P20, sans perturber le culot de billes
- ✓ Ne pas enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Laisser sécher les billes à température ambiante ≤5min
- ✓ Enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Ajouter 25µl de **Low TE** directement sur le culot pour disperser les billes
- ✓ Mélanger complètement la suspension par 5 pipetages successifs
- ✓ Vortexer les échantillons 10s
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Attendre au moins 1min ou jusqu'à ce que la solution soit limpide
- ✓ Transférer soigneusement le surnageant contenant l'ADN élué dans un tube PCR 0,2ml

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

#### F. Ion plus fragment Library Kit

= Liaison des adaptateurs aux fragments d'ADN double brin

**ATTENTION : Lors de la manipulation des adaptateurs et des barcodes, faire plus particulièrement attention à la contamination croisée !!! Changer fréquemment de gants et ouvrir un tube à la fois**

- ✓ Dans des tubes PCR de 0,2mL, mélanger :

Réactifs	Volume (µl)	
	50-100ng	1µg
DNA	≈25	≈25
<b>10X Ligase Buffer</b>	10	10
<b>Ion P1 Adapter</b>	2	10
<b>Ion Xpress™ Barcode X</b>	2	10
<b>dNTP Mix</b>	2	2
<b>Nuclease-free Water</b>	49	31
<b>DNA Ligase</b>	2	4
<b>Nick Repair Polymerase</b>	8	8
Total	100	100

- ✓ Mélanger par pipetage (**ATTENTION : ça mousse !!!**)
- ✓ Placer les tubes dans un thermocycleur et appliquer le programme suivant

Etape	Température	Temps
Hold	25°C	15min
Hold	72°C	5min
Hold	4°C	Hold

- ✓ Transférer le mélange dans un tube Eppendorf de 1,5ml

#### G. Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter)

= Purification des complexes ADN/adaptateurs

**ATTENTION : Toujours utiliser de l'éthanol à 70% fraîchement préparé (1ml par échantillon + excès) pour les étapes suivantes**

- ✓ Ajouter un volume d'**Agencourt AMPure XP Reagent** à l'échantillon

Taille des fragments	Volume d' <b>Agencourt AMPure XP Reagent</b> (μl)
400pb	100 (1 x volume échantillon)
200-300pb	120 (1,2 x volume échantillon)
100-150pb	150 (1,5 x volume échantillon)

- ✓ Pipeter 5 fois pour mélanger complètement la suspension de billes avec l'ADN
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Laisser incuber 5min à température ambiante
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Attendre 3min ou jusqu'à ce que la solution soit limpide
- ✓ Enlever soigneusement et jeter le surnageant, sans perturber le culot de billes
- ✓ Ne pas enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Ajouter 500μl d'éthanol 70% fraîchement préparé
- ✓ Incuber 30s
- ✓ Tourner les tubes accrochés sur le **DynaMag™-2** sur eux-mêmes deux fois pour faire bouger les billes autour de la paroi des tubes
- ✓ Attendre que la solution soit limpide
- ✓ Enlever soigneusement et jeter le surnageant, sans perturber le culot de billes
- ✓ Répéter le lavage à l'éthanol 70% une seconde fois
- ✓ Pour enlever l'éthanol résiduel, centrifuger brièvement
- ✓ Remettre les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Enlever doucement le reste du surnageant avec une P20, sans perturber le culot de billes
- ✓ Ne pas enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Laisser sécher les billes à température ambiante ≤5min
- ✓ Enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Ajouter 20μl de **Low TE** directement sur le culot pour disperser les billes
- ✓ Mélanger complètement la suspension par 5 pipetages successifs
- ✓ Vortexer les échantillons 10s
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Attendre au moins 1min ou jusqu'à ce que la solution soit limpide
- ✓ Transférer soigneusement le surnageant contenant l'ADN élué dans un tube PCR 0,2ml

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

#### H. MagMeDIP kit (Diagenode)

= Immunoprécipitation des complexes ADN/adaptateurs



## 1. Préparation des billes

**ATTENTION : Ne jamais laisser les billes à l'air libre sans tampon, elles ne doivent pas sécher !!!**

- ✓ Préparer le tampon de lavage (**bead wash Buffer**) en diluant au 1/5 le **MagBuffer A** (4°C) avec **Water** (4°C). Le volume nécessaire de tampon de lavage par IP est de 100µl →  $100/5 = 20\mu\text{l}$  **MagBuffer A** + 80µl **Water** (200µl **MagBuffer A** + 800µl **Water** pour 10 IP)
- ✓ Resuspendre les billes (**Magbeads** 4°C) et transférer 11µl de billes par IP dans un nouveau tube eppendorf de 1,5ml (RNase et DNase free) (110µl pour 10 IP)
- ✓ Mettre sur **Magnetic Rack**
- ✓ Enlever le surnageant et garder les billes
- ✓ Resuspendre les billes dans le tampon de lavage froid
- ✓ Mettre sur **Magnetic Rack**
- ✓ Enlever le surnageant et garder les billes
- ✓ Répéter ce lavage une fois de plus

Nombre d'IP	Volume de tampon (µl) par lavage	Volume de billes (µl)
1	27,5	11
10	275	110

- ✓ Resuspendre les billes dans 22µl de tampon de lavage par 1 IP (220µl pour 10 IP) et laisser dans la glace

## 2. Préparation du mix pour l'IP

- ✓ Préparation du mix dans des tubes PCR 0,2ml avec bouchons plats pour pas que ça fonde dans le thermocycleur
- ✓ Seulement dans un tube d'IP faire le mix suivant avec le meDNA et le unDNA

Réactifs	Volume pour 1 IP + Input (1) µl
<b>Water</b>	$57-20 = 37$
<b>MagBuffer A</b>	24
<b>MagBuffer B</b> (4°C)	6
<b>Positive meDNA control</b> (-20°C)	1,5
<b>Negative unDNA control</b> (-20°C)	1,5
<b>DNA sample</b> (-20°C)	20
Volume Total	90

- ✓ Dans les autres tubes faire le mix suivant sans le meDNA et le unDNA

Réactifs	Volume pour 1 IP + Input (1) µl
<b>Water</b>	3 (volume des deux contrôles) + 37 = 40
<b>MagBuffer A</b>	24
<b>MagBuffer B</b>	6
<b>DNA sample</b>	20
Volume Total	90

➔ **1µg d'ADN est nécessaire par IP !!!**

Nombre d'IP	Mix (μl)	Echantillon ADN (μl) à une concentration de 20ng/μl	Volume total (μl)
1	70	20	90

Remarque : Volume total de 90μl = 1 IP (75μl), 10% d'input (7,5μl) et un excès (7,5μl)

- ✓ Incuber 3min à 95°C
- ✓ Refroidir rapidement l'échantillon en mettant sur glace
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Prendre 7,5μl (10% input) de chaque IP et transférer dans une nouvelle barrette. Conserver l'input à 4°C
- ✓ Transférer 75μl de chaque IP dans une nouvelle barrette. Conserver à 4°C
- ✓ Jeter l'ancienne barrette
- ✓ Dans un nouveau tube, préparer le **Diluted Antibody mix** (voir tableau ci-dessous). Ajouter l'AC, le **MagBuffer A** et l'eau en premier. Ajouter le **MagBuffer C** par la suite

Réactifs	1 IP	10 IP
AC (μl)	0,15	1,5
<b>MagBuffer A</b> (μl)	0,60	6
<b>Water</b> (μl)	2,25	22,5
<b>MagBuffer C</b> (μl)	2	20
Volume final (μl)	5	50

- ✓ Ajouter 5μl de **Diluted Antibody mix** par tube d'IP qui contient déjà l'**IP incubation mix** et l'échantillon d'ADN
- ✓ Mélanger et ajouter 20μl de billes lavées par tube d'IP (volume final pour 1 tube d'IP = 100μl)
- ✓ Placer sur une roue et laisser en rotation toute la nuit ou 4H à 4°C

**ATTENTION : bien boucher les tubes pour ne pas avoir de fuite !!!**

### 3. Lavages

- ✓ Placer les **MagWash buffers** et le **Magnetic Rack** sur la glace. Réaliser les lavages sur glace ou en chambre froide
- ✓ Centrifuger brièvement les tubes d'IP et les placer sur le **Magnetic Rack** dans la glace, attendre 1min et enlever le tampon
- ✓ Ajouter par tube d'IP 100μl de **MagWash Buffer-1** froid
- ✓ **Pipetter doucement** pour resuspendre les billes (**sinon ça moussera !!!**)
- ✓ Incuber 4min à 4°C sur une roue en rotation
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer sur le **Magnetic Rack**
- ✓ Attendre 1min et enlever le tampon
- ✓ Garder les billes accrochées à la paroi
- ➔ Répéter le lavage 1 fois de plus
- ✓ Laver les billes une fois avec 100μl de **MagWash buffer-2** froid
- ✓ Après le dernier lavage, enlever le tampon, garder le culot de billes sur glace

### 4. Isolation de l'ADN

- ✓ Récupérer les tubes input qui sont à 4°C

- ✓ Préparer 50µl par IP et 100µl par Input de **complete buffer DIB** : ajouter 1µl de **Proteinase K** (-20°C) pour 100µl de **Buffer DIB** (50 µl sont nécessaires pour l'IP et 92,5µl sont nécessaires pour l'input → soit pour 10 IP + 10 inputs = 1500µl de **Buffer DIB** + 15µl de **Proteinase K**)
  - Ajouter 50µl de **complete buffer DIB** par IP et resuspendre les billes
  - Ajouter 92,5µl de **complete buffer DIB** au 7,5µl d'Input
- ⇒ Volume final dans chaque tube = 50µl pour IP et 100µl pour Input
- ✓ Incuber 15min à 55°C + incuber 15min à 100°C (Thermocycleur → User « Lucie » : « medip-dna-isol1 »)
- ✓ Centrifuger les tubes pendant 3min ou les placer sur le **Magnetic Rack** (attendre 1min)
- ✓ Transférer le surnageant dans un nouveau tube de 1,5ml

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

### I. Platinum® PCR SuperMix High Fidelity

= Amplification de la library

- ✓ Combiner les réactifs suivants dans un tube de taille approprié et mélanger par pipetage

Composé	Volume par échantillon d'ADN (µl)	
	50-100ng	1µg
<b>Platinum® PCR SuperMix High Fidelity</b>	100	200
<b>Library Amplification Primer Mix</b>	5	10
Library non amplifiée	25	50
Total	130	260

- ✓ Partager le mélange réactionnel dans plusieurs tubes PCR de 0,2ml pour ajuster au volume réactionnel recommandé par le fabricant du thermocycleur
- ✓ Placer les tubes dans le thermocycleur et lancer le programme de PCR indiqué dans le premier tableau. Appliquer le nombre de cycles préconisé dans le deuxième tableau

Stade	Etape	Température (°C)	Temps
Holding	Dénaturation	95	5min
Cycling	Dénaturation	95	15sec
	Hybridation	58	15sec
	Elongation	70	1min
Holding		4	Hold

Nombre de cycles par library
1µg
18

- ✓ Regrouper les différents échantillons séparés précédemment dans un tube Eppendorf de 1,5ml

### J. Agencourt AMPure XP kit (Beckman Coulter)

= Purification des complexes ADN/adaptateurs et sélection de taille.

**ATTENTION : Toujours utiliser de l'éthanol à 80% fraîchement préparé (1ml par échantillon + excès) pour les étapes suivantes**

- ✓ Ajuster le volume d'échantillon à 100µl. Si cela n'est pas possible adapter les volumes suivants
- ✓ Ajouter un volume d'**Agencourt AMPure XP Reagent** à l'échantillon

Paramètres de la banque d'ADN génomique	Taille approximative après sonication	150pb	200pb	250pb	300-400pb	400-500pb	500-700pb
	Taille après construction de la banque d'ADN génomique	270pb	320pb	400pb	400-500pb	500-600pb	600-800pb
Volume de billes (µl)	1 <sup>ère</sup> sélection	65	55	45	40	35	30
	2 <sup>ème</sup> sélection	25	25	25	20	15	15

- ✓ Pipeter 10 fois pour mélanger complètement la suspension de billes avec l'ADN
- ✓ Laisser incubé 5min à température ambiante
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Attendre 5min ou jusqu'à ce que la solution soit limpide
- ✓ Récupérer soigneusement et mettre dans un nouveau tube le surnageant qui contient l'ADN d'intérêt
- ✓ Jeter les billes qui contiennent les fragments larges non désirés
- ✓ Ajouter le volume approprié d'**Agencourt AMPure XP Reagent** au surnageant
- ✓ Pipeter 10 fois pour mélanger complètement la suspension de billes avec l'ADN
- ✓ Laisser incubé 5min à température ambiante
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Enlever soigneusement et jeter le surnageant, sans perturber le culot de billes
- ✓ Ne pas enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Ajouter 200µl d'éthanol **80%** fraîchement préparé
- ✓ Incuber 30s
- ✓ Tourner les tubes accrochés sur le **DynaMag™-2** sur eux-mêmes deux fois pour faire bouger les billes autour de la paroi des tubes
- ✓ Attendre que la solution soit limpide
- ✓ Enlever soigneusement et jeter le surnageant, sans perturber le culot de billes
- ✓ Répéter le lavage à l'éthanol 80% deux fois supplémentaires
- ✓ Ne pas enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Laisser sécher les billes à température ambiante ≤10min
- ✓ Enlever les tubes du **DynaMag™-2**
- ✓ Ajouter 25µl de **Low TE** directement sur le culot pour disperser les billes
- ✓ Mélanger complètement la suspension par pipetages successifs
- ✓ Vortexer les échantillons 10s
- ✓ Centrifuger brièvement
- ✓ Placer les tubes sur le **DynaMag™-2**
- ✓ Attendre au moins 5min ou jusqu'à ce que la solution soit limpide
- ✓ Transférer soigneusement le surnageant contenant l'ADN élué dans un tube Eppendorf de 1,5ml

Remarque : L'ADN peut être stocké à -20°C.

#### K. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)



### Annexe 3. Lignes de commandes

Lignes de commande utilisées sur le système d'exploitation Linux

```
-bash-4.1$ fastqc ../lonXpress_OXX_GRCm38.bam -o qcTACxx

-bash-4.1$ ../MarkDuplicates.jar I=../lonXpress_GRCm38.bam
O=../lonXpress_GRCm38_Marked.bam M=metric VALIDATION_STRINGENCY=SILENT
CREATE_INDEX=False

-bash-4.1$ samtools flagstats lonXpress_OXX_GRCm38_Marked.bam

-bash-4.1$ ../samtools view -b -F 1024 -q 50 ../lonXpress_OXX_GRCm38.bam
>../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE30_noDUP.bam

-bash-4.1$ ../macs2 callpeak -t ../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE50_noDUP.bam
-f BAM -g mm -n ../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE30_noDUP_MACS2 -B

-bash-4.1$ ../bedtools genomecov -bg -ibam
../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE30_noDUP.bam -g ../genomeref >
../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE30_noDUP.bg

-bash-4.1$ awk -F "\t" '(!($1~/GL/)&&($1~/JH/)){print $0}'
lonXpress_XX_QSCORE30_noDUP.bg | sed -e 's/MT/chrM/g' | sed -e 's/X/chrX/g' | sed -
e 's/Y/chrY/g' > lonXpress_XX_GRCm38QSCORE50_noDUP_UCSCcanon.bg

-bash-4.1$ ../bedGraphToBigWig
../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE30_noDUP_UCSCcanon.bg
../genomeref
../lonXpress_OXX_GRCm38QSCORE30_noDUP_UCSCcanon.bw
```

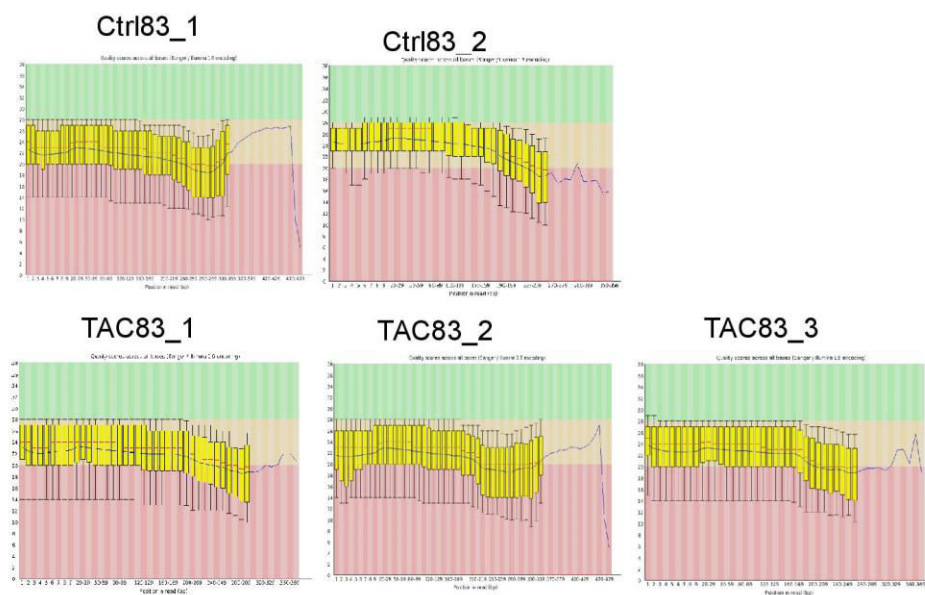
Lignes de commande *Diffbind* (Rstudio)



```
1 library(DiffBind)
2 setwd("/home/pouchelul/data/medip_seq_LT_CD4/")
3
4 Mice=read.csv("Mouse_samples.csv")
5 Mouse=dba(sampleSheet="Mouse_samples_not24.csv")
6 Mouse=dba.count(Mouse,minOverlap=2)
7
8 dba.plotPCA(Mouse,label=DBA_TREATMENT)
9 Mouse=dba.contrast(Mouse,categories=DBA_TREATMENT, minMembers=2)
10 Mouse=dba.analyze(Mouse, method=DBA_EDGER_CLASSIC, bReduceObjects=F)
11 dba.plotPCA(Mouse,DBA_ID,contrast=1,th=.05,label=DBA_TREATMENT)
12 Mouse_effective <- Mouse$contrasts[[1]]$edgeR$samples
13 Mouse_effective$effective.lib.size <- Mouse$contrasts[[1]]$edgeR$samples$lib.size*Mouse$contrasts[[1]]$edgeR$samples$norm.factors
14 Mouse_effective$scaling.factors <- min(Mouse_effective$effective.lib.size)/Mouse_effective$effective.lib.size
15 Mouse.DB=dba.report(Mouse)
16
17 write.table(as.data.frame(Mouse.DB), file = "DiffBind_Mouse.txt", append = FALSE, quote = TRUE, sep = ",",
18           eol = "\n", na = "NA", dec = ".", row.names = FALSE,
19           col.names = TRUE, qmethod = c("escape", "double"),
20           fileEncoding = "")
21 write.table(Mouse_effective, file="Mouse_scaling_factors.txt")
22 dba.plotMA(Mouse, th=0.05, bXY=TRUE)
23 dev.copy(png,'MAplot_Mouse.png')
24 dev.off()
25 dba.plotPCA(Mouse,DBA_ID,contrast=1,th=.05,label=DBA_TREATMENT)
26 dev.copy(png,'PCAplot_Mouse.png')
27 dev.off()
```

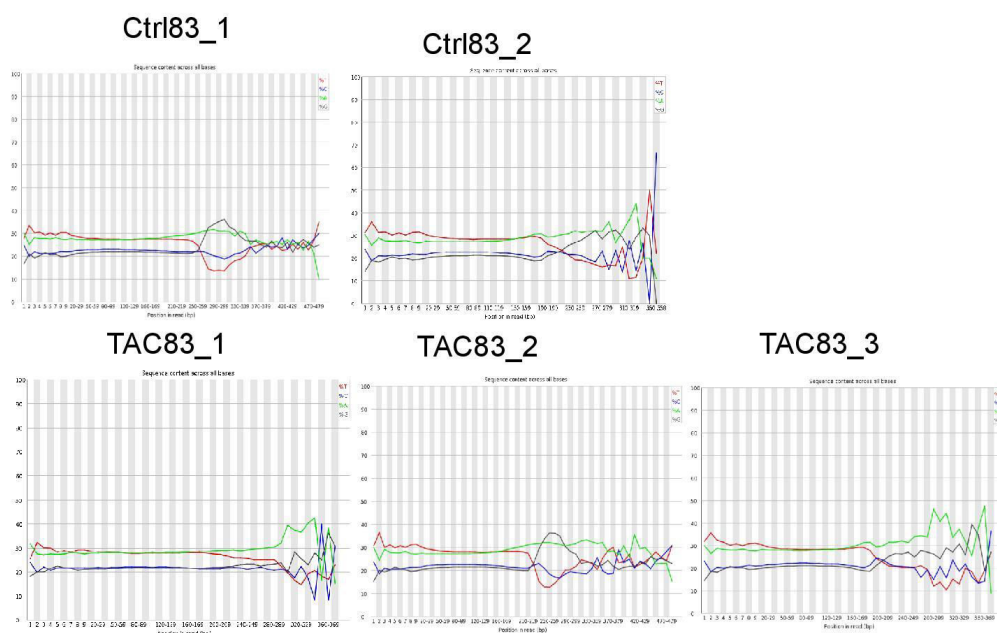
## Annexe 4. Rapports qualité FASTQC des fichiers de séquençage (groupes TAC et Ctrl « 83jours »)

### Per base sequence quality



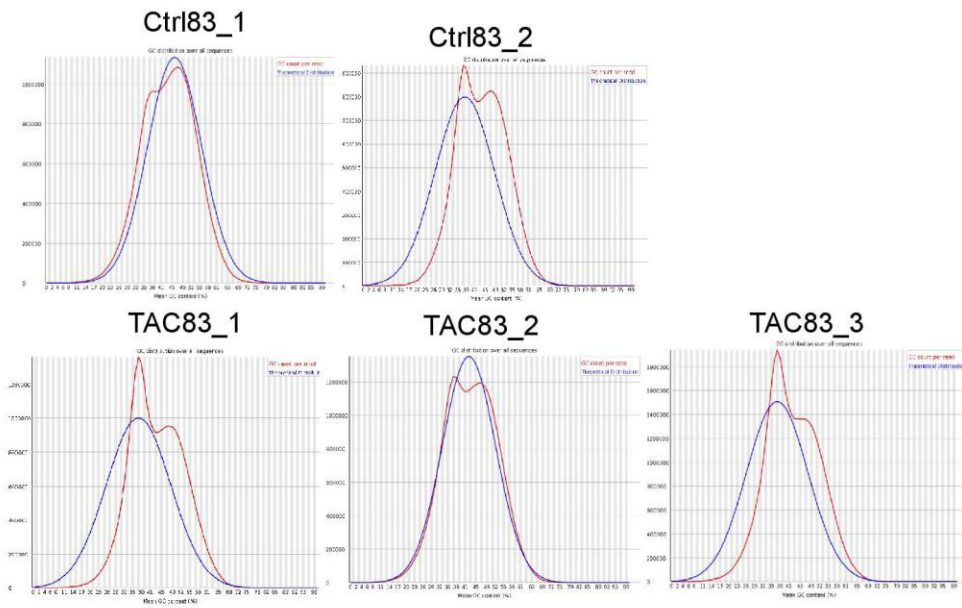
1

### Per base sequence content

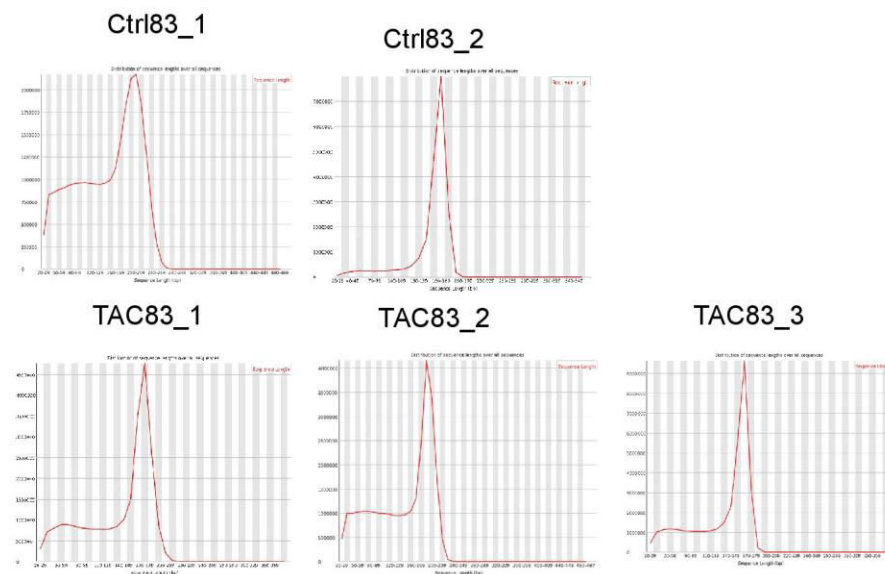


2

## Per sequence CG content

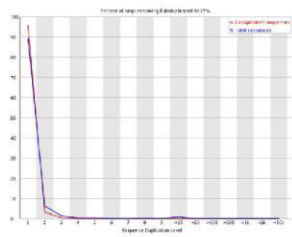


## Sequence lenght distribution

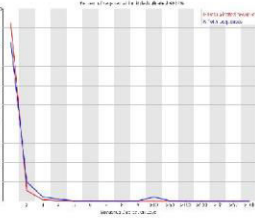


## Sequence duplication level

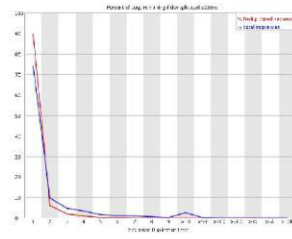
Ctrl83\_1



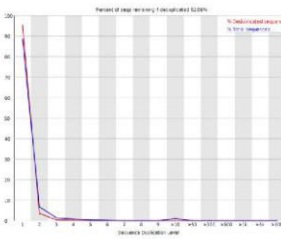
Ctrl83\_2



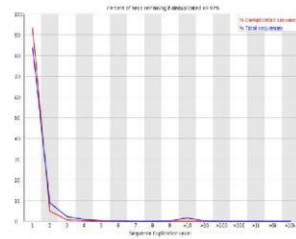
TAC83\_1



TAC83\_2

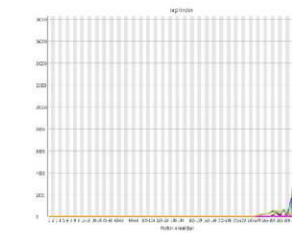


TAC83\_3

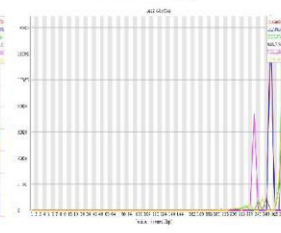


## Kmer content

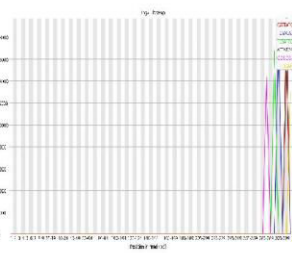
Ctrl83\_1



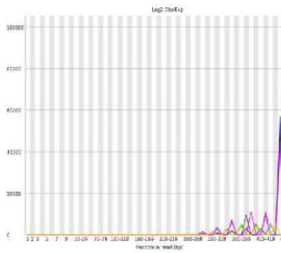
Ctrl83\_2



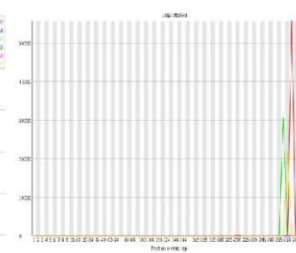
TAC83\_1



TAC83\_2



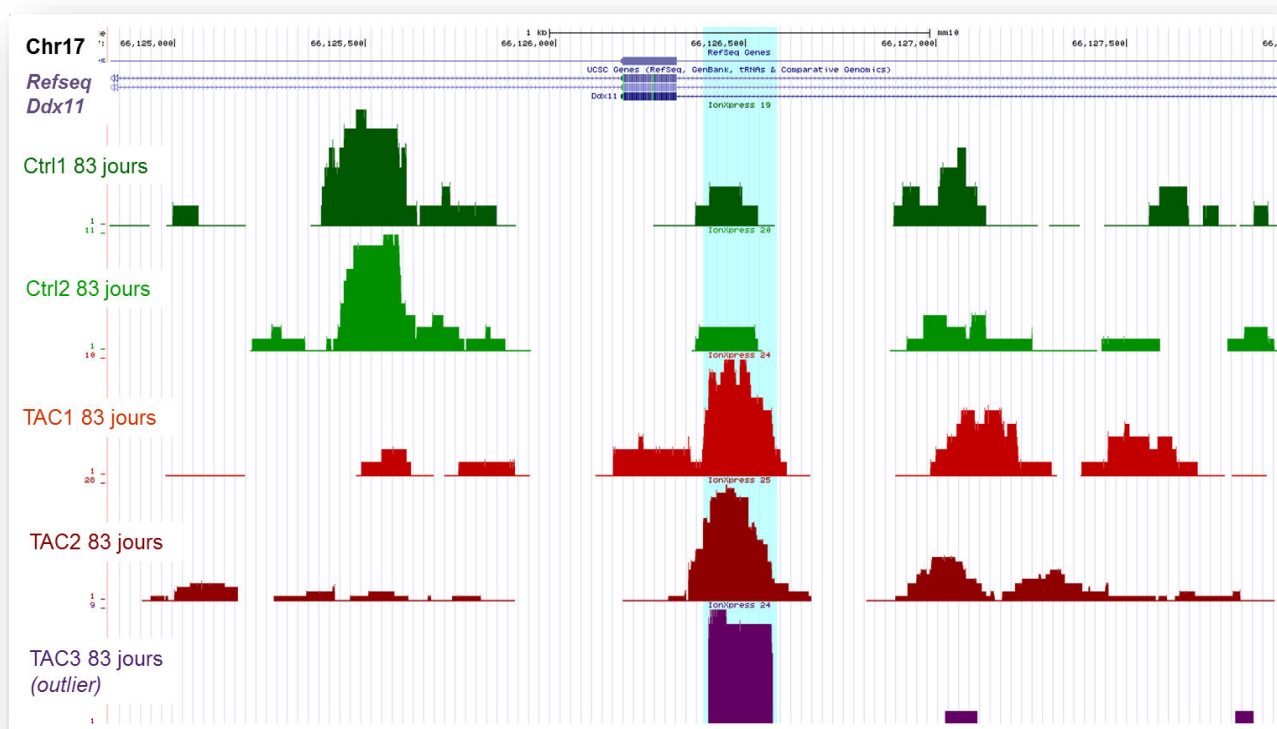
TAC83\_3

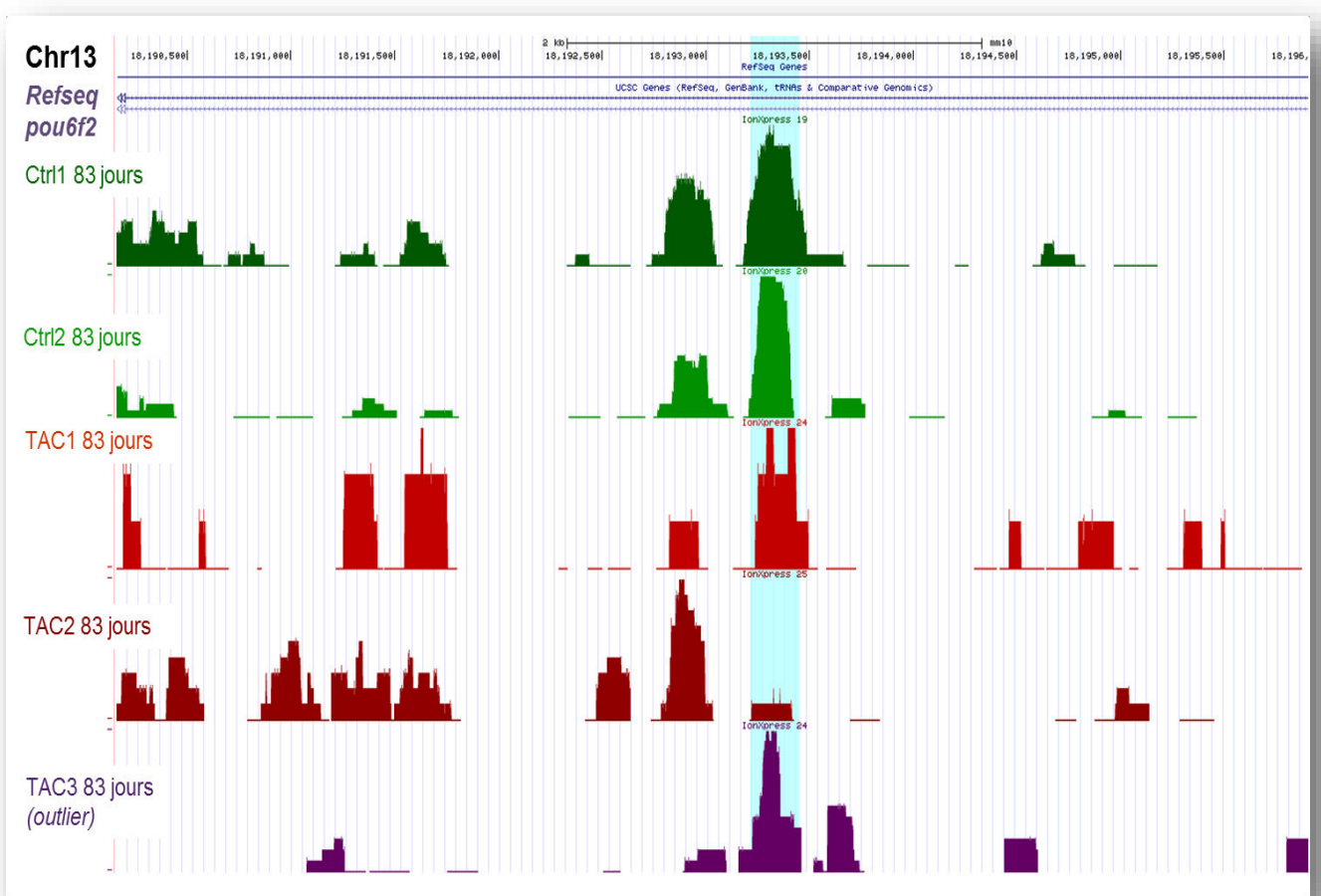
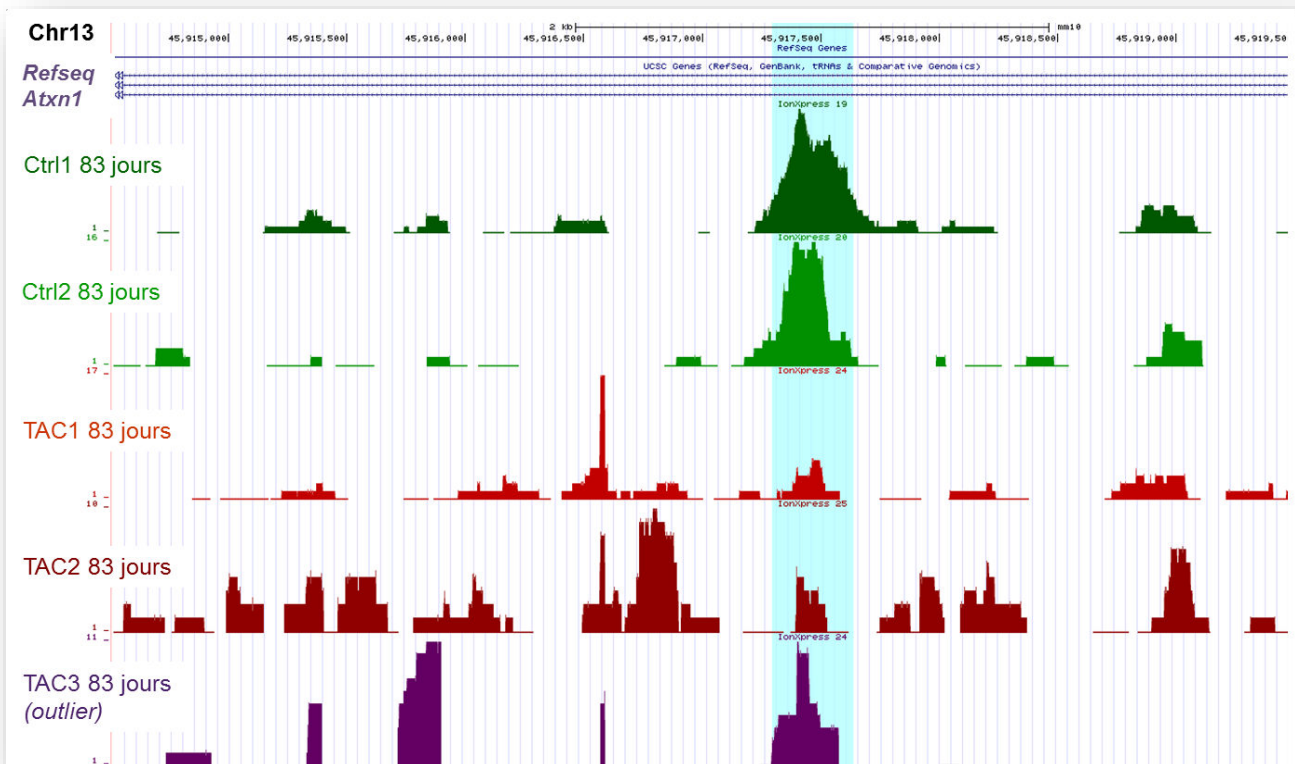




**Annexe 5. Visualisation des régions géniques identifiées comme DMRs selon l'analyse *Diffbind* (cf. Tableau 4).**

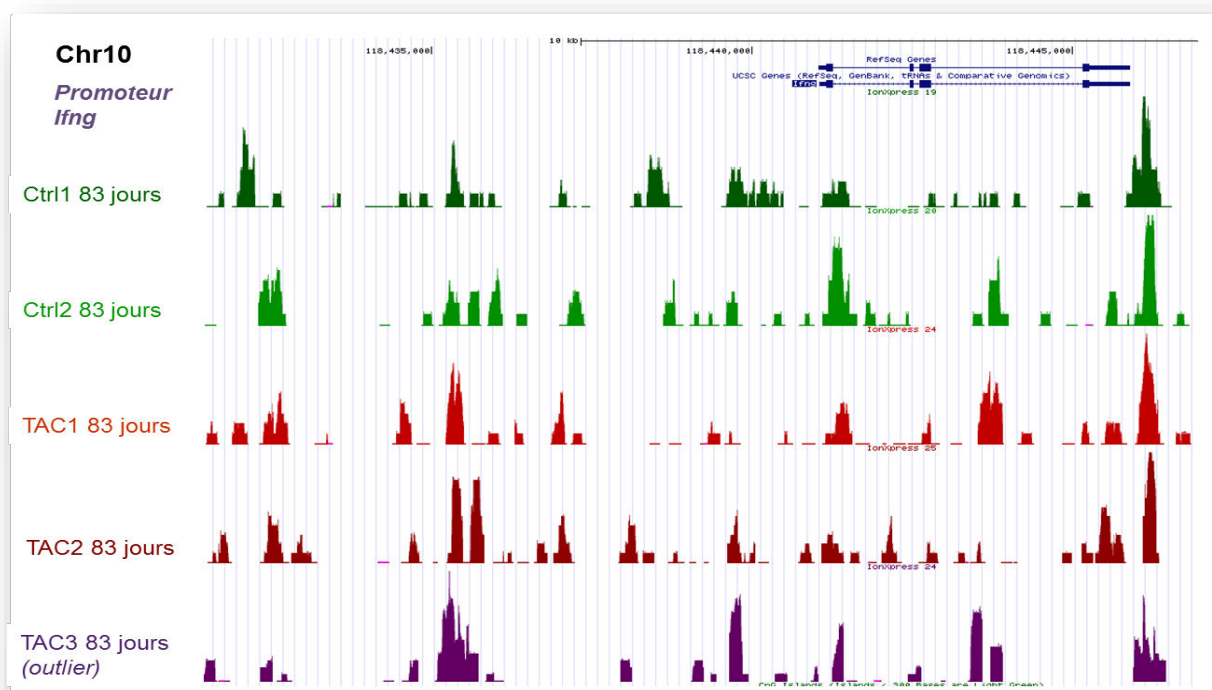
Dans l'ordre : *Vps37a* (région intronique) ; *Ddx11* (région intronique) ; *Atxn1* (région intronique) ; *Pou6f2* (région intronique) ; alignement au génome *Mus musculus* mm10 ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu))

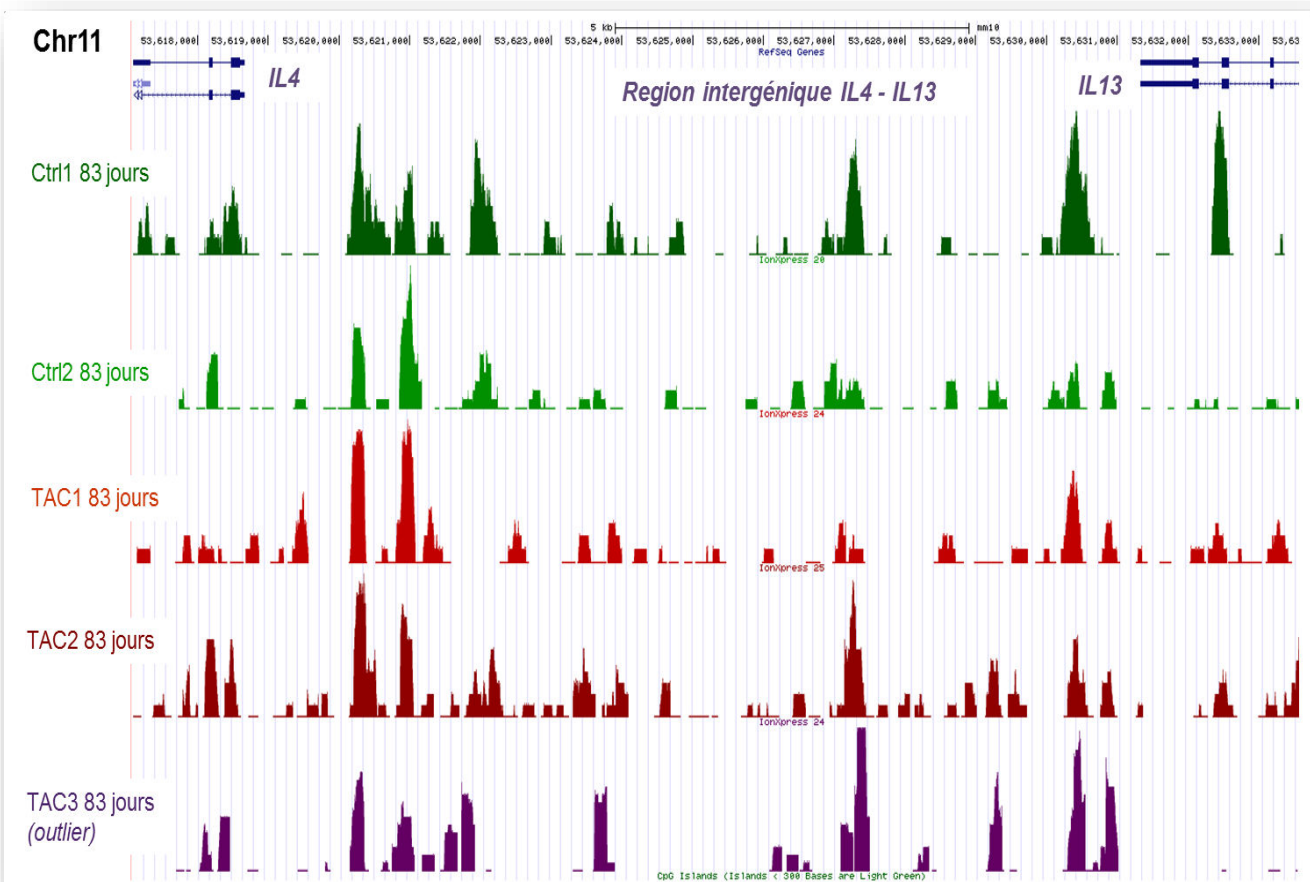




## Annexe 6. Visualisation des certains locus précédemment identifiés comme présentant des variations de la méthylation de l'ADN au sein du LT CD4 (cf. Tableau 2)

Dans l'ordre : *Il2* (promoteur), *Ifng* (promoteur), *Csf2* (promoteur), locus *Il4-Il13* (région intergénique) ;  
alignement au génome *Mus musculus* mm10 ([genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu))







# Table des matières

Remerciements.....	2
Liste des abréviations.....	3
Sommaire .....	4
Introduction.....	5
Chapitre 1. Eléments bibliographiques – Etat de l’art .....	7
A. Les inhibiteurs de la calcineurine .....	7
1. Traitement immunosuppresseur de référence en transplantation rénale.....	7
2. Mécanisme d’action : inhibition de la voie de la calcineurine.....	7
3. Indications et effets indésirables .....	9
4. Suivi thérapeutique pharmacologique des ICN .....	9
5. Recherche en pharmacogénétique.....	10
6. Biomarqueurs pharmacodynamiques.....	11
7. Pharmacogénétique des cibles des ICN .....	12
B. Epigénétique, régulation d’expression des gènes via la méthylation de l’ADN.....	13
1. L’épigénétique : mode de régulation de l’expression des gènes.....	13
2. La méthylation et l’hydroxyméthylation de l’ADN.....	15
3. Méthodes d’études de la méthylation de l’ADN.....	18
a. Analyses au bisulfite de sodium .....	18
b. Les techniques d’immunoprécipitation.....	20
4. Pharmacoépigénétique .....	21
Chapitre 2. Variabilité génétique et réponse aux ICN en transplantation.....	22
A. Variabilité génétique du système immunitaire .....	23
1. Rappel sur la réponse immunitaire .....	23
2. Polymorphismes génétiques de la réponse immune impliqués en transplantation rénale .....	24
3. Variabilité des gènes codants pour les protéines participant à la pharmacodynamie des immunosuppresseurs.....	39
B. Application en transplantation rénale : étude « POLYCIS ».....	60
C. Discussion .....	78

Chapitre 3. Modifications épigénétiques induites par l'exposition aux ICN .....	82
A. Hypothèses et justification de l'étude .....	82
1. Régulation épigénétique par des médicaments « non épigénétiques» .....	82
2. Régulation fonctionnelle du LT CD4 .....	82
3. Méthylation de l'ADN, en quête de biomarqueurs de la variabilité pharmacodynamique .....	85
4. Justification de l'étude .....	86
B. Travaux personnels : modification dynamique de la méthylation de l'ADN des LT CD4 après exposition à la ciclosporine et au tacrolimus .....	87
1. Matériels et méthodes .....	87
a. Culture cellulaire.....	87
b. Développement du MeDIP-qPCR.....	87
i. MeDIP .....	87
ii. Analyse par qPCR .....	88
c. Expérimentation animale .....	89
d. Isolation des LT CD4 murins.....	90
a. MEDIP-seq .....	90
b. Validation de la MeDIP par qPCR.....	91
c. Analyse bio-informatique .....	91
i. Qualité du séquençage .....	92
ii. Nettoyage du fichier BAM (SAM Tools et Mark duplicates) .....	92
iii. Identifications des pics (MACS2) .....	93
iv. Analyse différentielle .....	93
v. Visualisation des régions d'intérêts .....	94
2. Résultats.....	96
a. MeDIP-qPCR sur le modèle JURKAT .....	96
b. Expérimentation animale .....	97
c. Validation du MeDIP par qPCR .....	98
d. Analyse bio-informatique .....	98
i. Qualité du séquençage .....	99

ii. Analyse différentielle de la méthylation.....	100
3. Discussion.....	108
C. Perspectives.....	112
Conclusion générale.....	114
Bibliographie.....	116
Table des annexes .....	123
Table des matières.....	141
Table des illustrations .....	144
Table des tableaux.....	146

# Table des illustrations

Figure 1. Voie de la calcineurine au sein du lymphocyte T (Ag : antigène ; Calm: Calmoduline; Cn A: Calcineurine A; Cn B: Calcineurine B; Csa: Ciclosporine; Cyp A: Cyclophiline A; NFAT: Nuclear factor activated T cell). L'état phosphorylé du facteur NFAT est indiqué par un cercle vert (7).....	8
Figure 2. Principaux mécanisme de régulation épigénétique (32).....	14
Figure 3. Coopération entre les protéines de lecture des marques méthylées H3K ( <i>reader domain</i> ) et les protéines catalytiques ( <i>catalytic domain</i> ) pour apposer la marque cytosine méthylée sur l'ADN (extrait de <a href="http://denulab.discovery.wisc.edu">denulab.discovery.wisc.edu</a> ).....	15
Figure 4. Cycle de la déméthylation de l'ADN (33).....	16
Figure 5. Répartition de la méthylation de l'ADN chez les vertébrés (35) .....	17
Figure 6. Différents scénarios proposés pour le rôle de méthylation dans la régulation d'expression. 5mc : 5-methylcytosine, MBD : <i>methyl-CPG binding domain</i> (35).....	17
Figure 7. Réaction de réduction menée par le bisulfite de sodium ( $\text{HSO}_3^-$ ).....	18
Figure 8. Exemple d'amorces pour la PCR méthylation spécifique (MSP-F pour amorce sens et MSP-R pour amorce antisens) et pour le bisulfite sequencing (MIP-F pour amorce sens et MIP-R pour amorce antisens) ; U : unmethylated ; M : methylated (38).....	19
Figure 9. D'après Swati Kadam, Ph.D., Marketing Intern Aug, <i>Advances in Epigenetics, Illumina 2013</i> . ....	20
Figure 10. Principe du MeDIP (MagMeDIP Kit, Diagenode, <a href="http://www.diagenode.com">www.diagenode.com</a> ).....	21
Figure 11. Spécialisation du LT CD4 (Th: T helper ; STAT: <i>Signal transducer and activator of transcription</i> , facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire) (42) .....	24
Figure 12. Work flow du protocole MeDIP-seq (IP: immunoprécipitat). ....	91
Figure 13. Workflow du traitement bio-informatique des données de séquençage. Le circuit bleu correspond aux types de fichiers d'entrée et de sortie. (qscore : score de qualité d'alignement, DMR : <i>differentiated methylated regions</i> ).....	92
Figure 14. Fonction <i>DBA_count</i> .....	94
Figure 15. Conversion du fichier BAM en fichier BigWig .....	95
Figure 16. Enrichissement de la méthylation de l'ADN, exprimé en % d'input (fraction d'ADN non immunoprécipité) de la lignée JURKAT pour (a) les ADN contrôles non humains (nh meDNA : non human methylated DNA, nh unmeDNA : non human unmethylated DNA), (b) le promoteur de <i>TSH2B</i> , (c) le promoteur de <i>GAPDH</i> et (d) le promoteur d' <i>IL2</i> dans le modèle cellulaire JURKAT après activation et/ou traitement par ICN (CsA : ciclosporine, TAC : tacrolimus) (représenté par la moyenne et l'écart type obtenus sur réplicats biologiques).....	96



Figure 17. Enrichissement de la méthylation de l'ADN, exprimé en % d'input (fraction d'ADN non immunoprécipité) des LT CD4 au niveau (a) du promoteur de <i>Gapdh</i> (région contrôle hypométhylée) et (b) du promoteur de <i>Tsh2b</i> (région contrôle hyperméthylée).....	98
Figure 18. Visualisation de l'Ig DMR dans le cluster Dlk1-Dio3 et les profils de méthylation des échantillons TAC et Ctrl 83 jours, alignés sur la séquence de référence du gène (Refseq) (mm10) (genome.ucsc.edu/). La région surlignée en bleu correspond à l'Ig DMR. ....	100
Figure 19. Graphe de corrélation des <i>counts</i> (tous les échantillons du groupe TAC et Ctrl, 83 jours) .....	101
Figure 20. Analyse en composant principal des <i>counts</i> (tous les échantillons du groupe TAC et Ctrl, 83 jours) .....	102
Figure 21. Graphe de corrélation des <i>counts</i> (après exclusion du TAC1, numéro 24).....	103
Figure 22. Visualisation du promoteur de <i>Calm2</i> et des profils de méthylation des échantillons TAC et Ctrl 83 jours, alignés sur la séquence de référence du gène (Refseq) (mm10) (genome.ucsc.edu/). La région surlignée en bleu correspond à la DMR identifiée.....	104
Figure 23. Visualisation UCSC du gène <i>Il12rb1</i> (genome.ucsc.edu/). ....	105
Figure 24. Analyse en composant principal réalisée sur les <i>counts</i> couvrant des DMRs identifiées (après exclusion de l'échantillon TAC, numéro 24).....	106

# Table des tableaux

Tableau 1. Gènes identifiés par Suárez-Álvarez et col. et les modifications épigénétiques rapportées lors de la différenciation des cellules immunitaires (63).....	83
Tableau 2. Locus avec variation de la méthylation de l'ADN en lien avec certaines fonctions des LT CD4 (MBD2 : <i>methyl-CpG binding domain protein 2</i> , Diff. : différenciation). ....	84
Tableau 3. Séquence de l'essai TaqMan utilisé pour l'étude d' <i>IL2</i> .....	88
Tableau 4. Liste des DMRs identifiées (avec un $FDR < 0,05$ ) dans l'analyse des échantillons issus du groupe TAC, 83jours.....	107

